



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CORDOBA

Facultad de Ciencias Químicas

El presente trabajo de tesis es presentado a la Escuela de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas para optar el grado de Magíster en Ciencias Químicas.

“Cambios metabólicos inducidos y Resveratrol como fitoalexina involucrada en la respuesta a la infección viral por *Leafroll virus* en *Vitis vinifera* L.”

Maestrando: Prof. Sheila Sofía Murúa Rodríguez

Lugar de desarrollo de la investigación: Instituto de Ciencias Básicas (ICB) – Universidad Nacional de San Juan e Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV) – CONICET- Universidad Nacional de Córdoba.

Córdoba, Argentina

2022

Director de tesis:

Dr. Daniel Alfredo Bustos

Co-directora de tesis:

Dra. Adriana Pacciaroni

Comisión evaluadora:

Dra. Viviana Nicotra (IMBIV-CONICET)

Dra. Susana Núñez Montoya (IMBIV-CONICET)

Evaluadora externa:

Dra. Mónica Nazareno (INQUINOA-UNSE)

DEDICATORIA

A mi madre, por su infinito amor, valores, fortaleza y perseverancia, que me ha permitido llegar a esta instancia.

A mis hermanos, por ser el pilar en el que me sostengo.

A Mauro, mi compañero, por su apoyo incondicional siempre.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi familia por su apoyo incondicional siempre, sin su apoyo económico y emocional, nunca hubiera llegado a donde estoy. Todo se los debo a ellos, estaré eternamente agradecida.

A la Lic. Delia Pappano, quien ha sido mi profesora y mentora en el camino de la investigación científica.

A mi director de tesis, Dr. Daniel Bustos, quien me brindó todo su tiempo y conocimientos para desarrollar este trabajo.

A las Dras. Susana Nuñez Montoya y Adriana Pacciaroni por su infinita predisposición, por recibirme cálidamente en sus lugares de trabajo las veces que fue necesario. Sin ello, gran parte de esta tesis no se hubiera podido desarrollar.

A todas aquellas personas que de una u otra forma colaboraron en el desarrollo de este trabajo.

RESUMEN

La “uva” es uno de los principales productos agrícolas que se cosechan en Argentina, su destino es tanto para vinificar como para consumo en fresco, en ambos casos con destino al comercio tanto interno como externo. Las principales provincias productoras son Mendoza y San Juan, siendo un mercado de relevante importancia económica en el país.

Cuando una planta es infectada por algún patógeno específico, esta responde de diversas formas, principalmente disminuyendo o aumentando el contenido de algunos metabolitos primarios y secundarios que se traduce en una menor calidad del fruto, en cuanto a color de las bayas, peso y grado azucarino; lo cual en definitiva afecta el rendimiento de la cosecha y su comercialización, causando importantes pérdidas económicas para los productores. Se ha estudiado profundamente la respuesta del metabolismo secundario de las plantas de “vid” cuando ésta es afectada por patógenos endémicos como *Botrytis cinerea* o *Plasmopara viticola*. A lo largo de numerosas investigaciones, se han propuesto diversas soluciones para combatir estos patógenos o generar especies resistentes a ellos. Sin embargo, estos estudios no se han extendido a patógenos menos comunes como virus o fitoplasmas que afectan a la planta de “vid”. Resulta de vital importancia conocer el comportamiento fisiológico y metabólico de la “vid” cuando es afectada también por patógenos poco comunes, como por ejemplo el virus *Grapevine Leafroll associated virus-3*, ya que desde hace algunos años éste se reporta como un patógeno de importancia en algunos países debido a su difícil diagnóstico temprano y rápida propagación.

El objetivo del presente trabajo fue analizar el incremento de metabolitos primarios y secundarios en hojas de *Vitis vinifera* L. cv Flame Seedless (Vitaceae) como respuesta al estrés inducido por la infección con *Grapevine leafroll virus associated virus-3* (GLRaV-3), *Grapevine leafroll virus associated-2* (GLRaV-2) y *Grapevine virus A* (GVA), con el fin de identificar fitoalexinas específicas para esta infección. Se encontró un aumento en la concentración de α -tocoferol, azúcares solubles, proteínas solubles, polifenoles totales, prolina y glicina betaína como metabolitos primarios y secundarios, y un aumento en la síntesis de *trans*-resveratrol como fitoalexina específica inducida.

ABSTRACT

The "grape" is one of the main agricultural products that are harvested in Argentina, its destination is both for vinification and for fresh consumption, in both cases destined for both internal and external trade. The main producing provinces are Mendoza and San Juan, being a market of relevant economic importance in the country.

When a plant is infected by a specific pathogen, it responds in various ways, mainly by decreasing or increasing the content of some primary and secondary metabolites, which translates into a lower quality of the fruit, in terms of berry color, weight and sugar content. ; which ultimately affects the yield of the harvest and its commercialization, causing important economic losses for the producers. The secondary metabolic response of grapevine plants when it is affected by endemic pathogens such as *Botrytis cinerea* or *Plasmopara viticola* has been deeply studied. Throughout numerous investigations, various solutions have been proposed to combat these pathogens or generate species resistant to them. However, these studies have not been extended to less common pathogens such as viruses or phytoplasmas that affect the "vine" plant. It is vitally important to know the physiological and metabolic behavior of the "vine" when it is also affected by rare pathogens, such as the *Grapevine Leafroll associates virus-3*, since for some years it has been reported as an important pathogen in some countries due to its difficult early diagnosis and rapid spread.

The objective of this work was to analyze the increase of primary and secondary metabolites in leaves of *Vitis vinifera* L. cv Flame Seedless (Vitaceae) in response to stress induced by infection with *Grapevine leafroll virus associated virus-3* (GLRaV-3), *Grapevine leafroll virus associated-2* (GLRaV-2) and *Grapevine virus A* (GVA), in order to identify specific phytoalexins for this infection. An increase in the concentration of α -tocopherol, soluble sugars, soluble proteins, total polyphenols, proline and glycine betaine as primary and secondary metabolites, and an increase in the synthesis of *trans*-resveratrol as a specific induced phytoalexin were found.

LISTADO DE ABREVIATURAS

- ERO: Especies Reactivas de Oxígeno
- HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Performance (por sus Siglas en inglés High Performance Liquid Chromatography)
- LC-MS-MS: cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
- MRM: Multiple Reaction Monitoring – Metodología cromatográfica donde el primer cuadruplo (Q1) filtra un ion precursor específico.
- PE1V: planta infectada con un virus
- PE2V: planta infectada con dos virus
- PE3V: planta infectada con tres virus
- PF: peso fresco
- PS: planta sana
- ROS: Especies Reactivas de Oxígeno (por sus siglas en inglés, Reactive Oxygen Species)
- SCAN: cromatograma de escaneo completo en un rango determinado de masas.
- TIC: Cromatograma total de iones (por sus siglas en inglés Total Ion Chromatogram)
- T_r : tiempo de retención
- WD: peso seco

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	II
AGRADCEIMEINTOS.....	III
RESUMEN.....	IV
ABSTRACT.....	V
LISTADO DE ABREVIATURAS.....	VI

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1-Introducción.....	1
1.1.1-Importancia económica de la actividad vitícola en Argentina y el mundo.....	1
1.1.2-Descripción taxonómica de la vid y cultivo.....	2
1.1.2.1-Clasificación taxonómica de la vid.....	2
1.1.2.2-Distribución del cultivo de vides en Argentina.....	2
1.1.3-Causas principales e importancia de las pérdidas en cultivares de vid.....	3
1.1.4-Microorganismos causantes de enfermedades más frecuentes en <i>Vitis vinifera</i> L.....	4
1.1.5-Virus que afectan a la vid y su clasificación taxonómica.....	4
1.1.6-Enfermedad del enrollamiento de la vid.....	6
1.1.7-Mecanismos de infección por <i>Leafroll virus</i> y su transmisión.....	6
1.1.8- Síntomas característicos de las enfermedades causadas por <i>Leafroll virus</i>	8
1.1.9- Caracterización de las infecciones (mecanismos de defensa).....	7
1.2-Hipótesis de trabajo.....	11
1.3- Objetivos.....	12
1.3.1-Objetivo general.....	12
1.3.2-Objetivos específicos.....	12

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1-Materiales.....	13
2.1.1-Equipamiento utilizado.....	13
2.1.2 Equipo utilizado para Cromatografía líquida de alta resolución- Espectrometría de masas (HPLC-MS).....	13
2.1.3-Solventes y reactivos.....	13
2.1.4- Características de los cultivos y ubicación geográfica.....	14
2.1.5- Selección del Material vegetal.....	15

2.1.6-Identificación de los virus.....	15
2.1.7- Preparación de las muestras a analizar.....	16
2.2-MÉTODOS.....	17
2.2.1-Extracción ,identificación y cuantificación de <i>trans</i> -resveratrol.....	17.
2.2.2-Condiciones de análisis de los extractos por HPLC-MS.....	18
2.2.2.1-Curva de calibración por HPLC-MS.....	19
2.2.3-Determinación de cambios en metabolitos primarios y secundarios involucrados en respuesta a la infección viral.....	20
2.2.3.1-Determinación de α -tocoferol.....	20
2.2.3.2-Determinación de capacidad antioxidante.....	21
2.2.3.3-Determinación de fenoles totales.....	22
2.2.3.4-Determinación de azúcares solubles.....	23
2.2.3.5-Determinación de proteínas solubles.....	24
2.2.3.6-Determinación de prolina.....	26
2.2.3.7-Determinación de Glicina-betaína.....	27
2.2.4-Análisis estadísticos.....	28
CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
3.1-RESULTADOS.....	29
3.1.1-IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE <i>TRANS</i> -RESVERATROL COMO FITOALEXINA SINTETIZADA EN RESPUESTA A LA INFECCIÓN VIRAL.....	29
3.1.2-DETERMINACIÓN DE METABOLITOS PRIMARIOS Y SECUNDARIOS INVOLUCRADOS EN RESPUESTA A LA INFECCIÓN VIRAL.....	30
3.2-DISCUSIÓN.....	37
3.2.1-RESVERATROL COMO FITOALEXINA INDUCIDA EN RESPUESTA AL ESTRÉS.....	37
3.2.2-METABOLITOS PRINCIPALES INVOLUCRADOS EN LA INFECCIÓN.....	40
CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS A FUTURO	
4.1-CONCLUSIÓN GENERAL.....	46
4.2-PERSPECTIVAS A FUTURO.....	46
BIBLIOGRAFÍA.....	47
ANEXO I: Cromatogramas de puntos de curva de calibración con <i>trans</i> -resveratrol estándar.....	53
ANEXO II: Cromatogramas TIC Y MRM de extractos buscando resveratrol y sus derivados.....	56
ANEXO III: Cromatogramas modo SCAN de extractos y espectros de masas correspondientes.....	57

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 - INTRODUCCION

1.1.1 - Importancia económica de la actividad vitícola en Argentina y el mundo.

La producción de uvas en el mundo entero representa una actividad económica de suma importancia, la mayoría de los países las cultivan (Fig. 1), presentando el continente europeo el 40,9% de la producción, Asia el 30,1% y el continente americano el 20% (FAO, 2018). La uva se la clasifica como fruto primario, representando el octavo producto más producido en el mundo (Fig. 2), siendo Argentina el séptimo país productor de uvas (Fig. 3) (FAO, 2018).

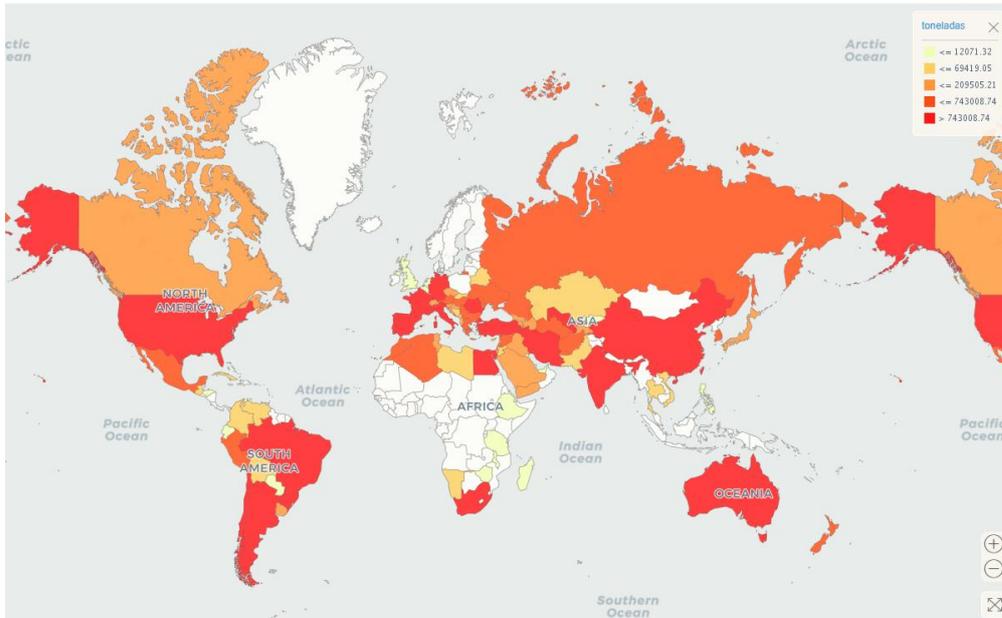


Figura 1: Producción (medida en toneladas) de uvas a escala mundial (FAO, 2018).

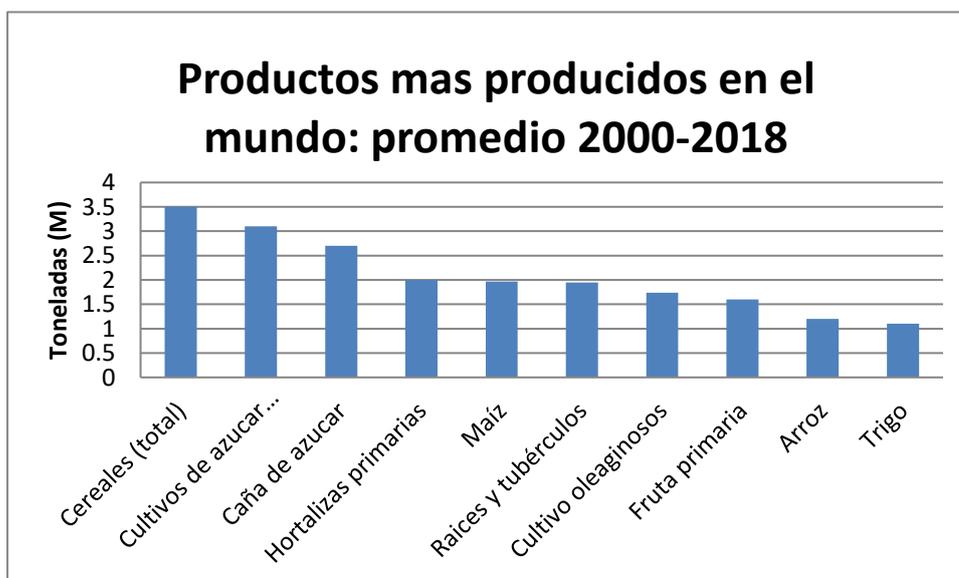


Figura 2: Principales alimentos producidos a nivel mundial (FAO, 2018).

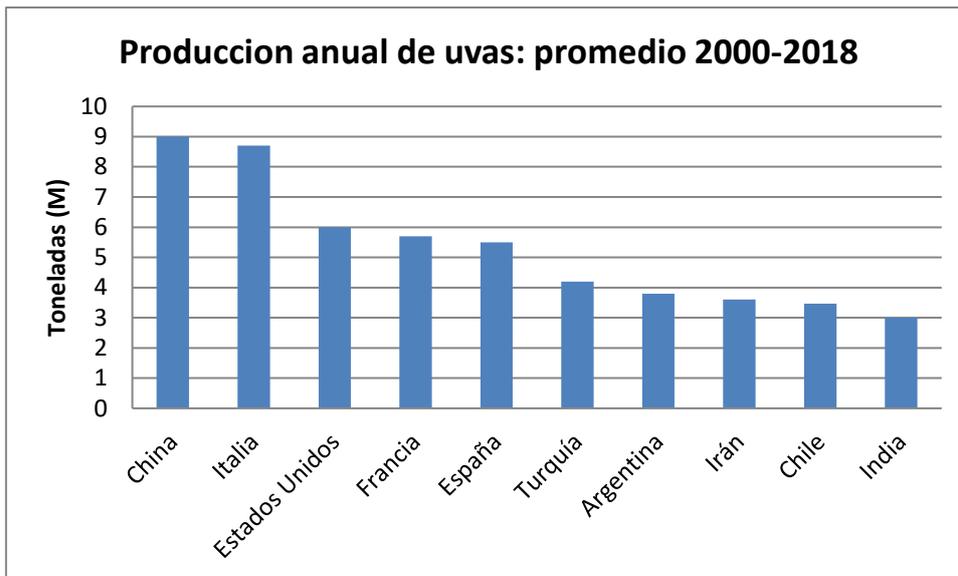


Figura 3: Producción (medida en millones de toneladas) de uvas a nivel mundial según la importancia por países (FAO, 2018).

1.1.2 - Descripción taxonómica de la vid y cultivo

1.1.2.1 - Clasificación taxonómica de la vid

- Reino: Plantae
- División: Magnoliophyta
- Clase: Magnoliopsida
- Orden: vitales
- Familia: Vitaceae
- Género: *Vitis*
- Especie: *Vitis vinifera* L.

1.1.2.2 - Distribución del cultivo de vides en Argentina

Las principales provincias productoras de uva en el país son Mendoza y San Juan representando el 77,8 y el 10,8% respectivamente; mientras que Neuquén, Rio Negro, Catamarca, Córdoba, La Rioja y Salta representan el resto de la producción(Fig. 4)(INV, 2018).

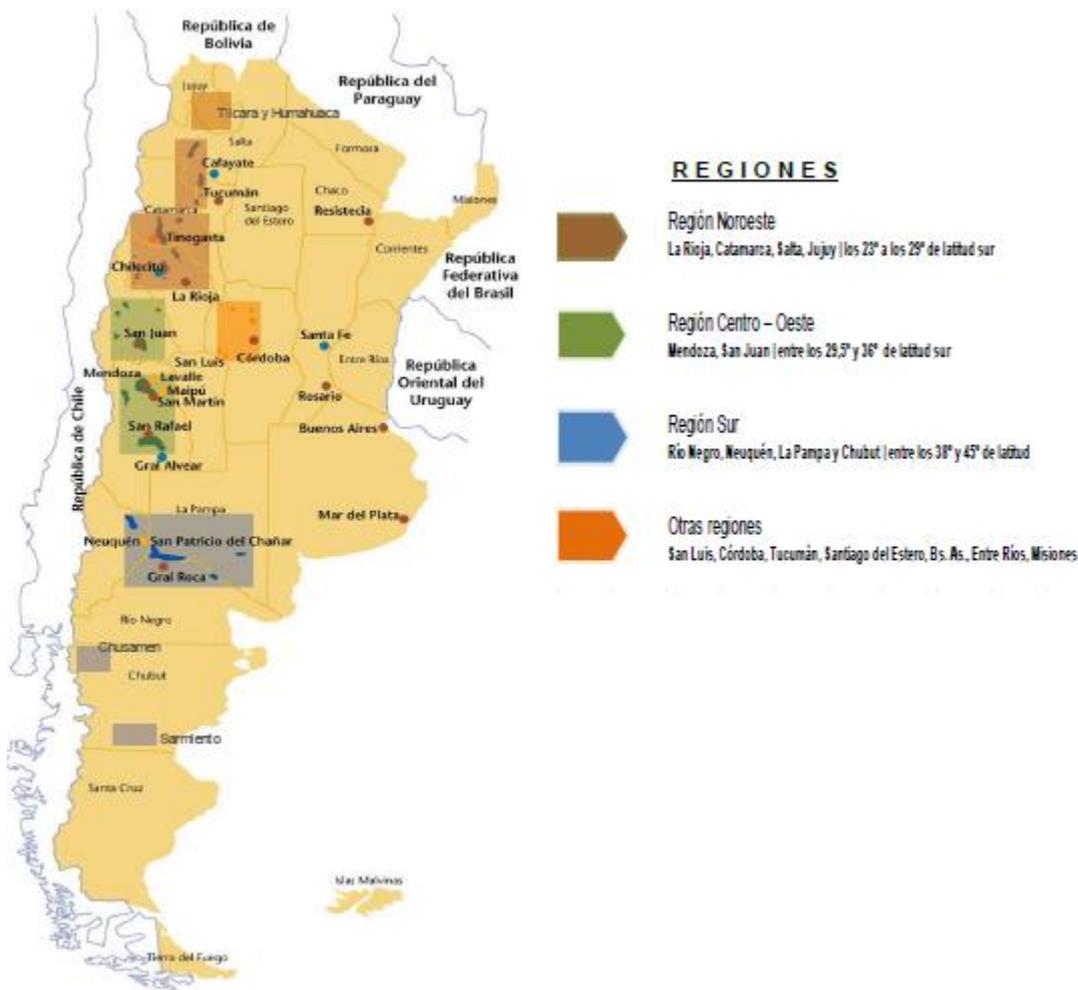


Figura 4: Mapa de Argentina en el que se señalan las principales regiones vitivinícolas (INV, 2018).

1.1.3 - Causas principales e importancia de las pérdidas en cultivares de vid

Vitis vinifera L., popularmente conocida como “vid” es afectada por diversos microorganismos patógenos que causan daño en el follaje, raíces y madera. Entre los agentes causales se puede mencionar los hongos, bacterias, virus y nematodos, que pueden provocar pérdidas importantes en rendimiento, como también en la calidad comercial de la uva de mesa. Estos agentes patógenos pueden afectar a las plantas en diferentes estados fenológicos y disminuir la vida útil de ellas, así como también reducir la calidad de sus frutos. Dependiendo de la incidencia y severidad de los problemas fitopatológicos, éstos pueden transformarse en factores limitantes para la producción, provocando pérdidas económicas a los productores y dificultades en la comercialización y exportación. Dependiendo de la severidad de cada enfermedad variará según las características climáticas que se presente en cada región. En localidades que presentan condiciones de alta humedad o agua libre durante la temporada de crecimiento, las enfermedades pueden ser la principal limitante del cultivo en términos económicos (INIA, Chile)

1.1.4 - Microorganismos causantes de enfermedades más frecuentes en *Vitis vinífera* L.

Más de setenta agentes infecciosos entre virus, viroides, fitoplasmas, bacterias xilemáticas transmitidas por insectos, hongos y nematodos se han registrado en vides. Esto representa el mayor número de patógenos intracelulares jamás encontrado en un solo cultivo.

Entre las enfermedades que afectan con mayor frecuencia a la “vid”, la pudrición gris es la principal causa de pérdidas en el cultivo, siendo causada por el hongo *Botrytis cinerea*, un patógeno necrotrófico, que puede alojarse y permanecer en el fruto desde su cosecha hasta su comercialización (Grace Armijo et al., 2013).

La enfermedad conocida como “mildiú polvoriento”, es causada por un hongo biotrófico llamado *Erysiphe necator*. Se manifiesta como un polvo grisáceo en la superficie del tejido colonizado, principalmente afecta a las hojas y tallos, disminuye el grado azucarino y acidez de las bayas (Galoutry, et al, 2001).

Finalmente, otra de las enfermedades más estudiada y conocida es la denominada “Peronospera de la vid”, la cual es causada por el hongo fitopatógeno *Plasmopara viticola* (Grace Armijo et al., 2013); esta enfermedad afecta principalmente las hojas, donde pueden observarse manchas de aspecto húmedo y luego cloróticas con bordes difusos (Boletín AAD, 2020).

Dentro de las infecciones víricas se encuentran la enfermedad del “Enrollamiento de la vid”, conocida por su sigla en inglés GLD (Grapevine Leafroll Disease). Su principal agente etiológico es el virus *Grapevine leafroll-associated virus-3* (GLRaV-3), que a menudo suele ir asociado en una infección mixta con otros virus del género *Grapevine*. Esta enfermedad se caracteriza fundamentalmente por impactar de forma negativa en la calidad del fruto, reduciendo su tamaño y grado azucarino (Alabi et al., 2016).

1.1.5 -Virus que afectan a la vid y su clasificación taxonómica

Como ya se dijo, se han reportado 65 virus que afectan la planta de la “vid”. En la Tabla 1 se han resumido todos los reportados hasta el momento.

Familia	Género	Especie
Virus con genoma DNA simple cadena		
<i>GEMINIVIRIDAE</i>	Indeterminado	<i>Grapevine cabernet franc-associated virus</i> (GCFaV)
<i>CAULIMOVIRADAE</i>	<i>Badnavirus</i>	<i>Grapevine vein clearing virus</i> (GVCV)
Virus con genoma RNA doble cadena		
<i>REOVIRIDAE</i>	<i>Oryzavirus</i>	Virus inanimados
<i>ENDORNAVIRIDAE</i>	<i>Endornavirus</i>	Dos virus inanimados
<i>PARTITIVIRIDAE</i>	<i>Alpbacryptovirus</i>	<i>Raphanus sativus cryptic virus 3</i> (RscV) <i>Beetcryptic virus 3</i> (BCV-3)
Virus con genoma RNA simple en sentido negativo		
<i>BUNYAVIRIDAE</i>	<i>Tospovirus</i>	<i>Tomato spotted wilt virus</i> (TSWV)

Familia	Género	Especie
Virus con genoma RNA simple en sentido positivo		
CLOSTEROVIRIDAE	<i>Closterovirus</i>	<i>Grapevine leafroll associated virus 3</i> (GLRaV-3)
	<i>Ampelovirus</i>	<i>Grapevine leafroll associated virus 1</i> (GLRaV-1) <i>Grapevine leafroll associated virus 2</i> (GLRaV-2) <i>Grapevine leafroll associated virus 4</i> (GLRaV-4) <i>Grapevine leafroll associated virus 7</i> (GLRaV-7)
	<i>Velarivirus</i>	
ALPHAFLEXIVIRIDAE	<i>Potexvirus</i>	<i>Potato virus X</i> (PVX)
BETAFLEXIVIRIDAE	<i>Foveavirus</i>	<i>Grapevine rupestris stem pitting associated virus</i> (GRSPaV)
	<i>Trichovirus</i>	<i>Grapevine inner necrosis virus</i> (GINV) <i>Grapevine pinot gris virus</i> (GPGV)
	<i>Vitivirus</i>	<i>Grapevine virus A</i> (GVA) <i>Grapevine virus B</i> (GVB) <i>Grapevine virus D</i> (GVD) <i>Grapevine virus E</i> (GVE) <i>Grapevine virus F</i> (GVF)
POTYVIRIDAE	<i>Potyvirus</i>	<i>Bean common mosaic virus</i> (BCMV)
Virus con genoma DNA cadena simple (partículas en forma de varilla)		
VIRGAVIRIDAE	<i>Tobamovirus</i>	<i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV) <i>Tomato mosaic virus</i> (ToMV)
Virus con RNA cadena simple (partículas isoméricas)		
SECOVIRIDAE	<i>Fabavirus</i>	<i>Broadbean wilt virus</i> (BBWV)
	<i>Nepovirus</i>	<i>Arabis mosaic virus</i> (ArMV) <i>Blueberry leaf mottle virus</i> (BBLMV) <i>Cherry leafroll virus</i> (CLRV) <i>Grapevine bulgarian latent virus</i> (GBLV) <i>Grapevine Anatolian ringspot virus</i> (GARSV) <i>Grapevine deformation virus</i> (GDefV) <i>Grapevine crome mosaic virus</i> (GCMV) <i>Grapevine fanleaf virus</i> (GFLV) <i>Grapevine Tunisian ringspot virus</i> (GTRV) <i>Peach rosette mosaic virus</i> (PRMV) <i>Raspberry ringspot virus</i> (RpRSV) <i>Tobacco ringspot virus</i> (TRSV) <i>Tomato blackring virus</i> (TBRV) <i>Strawberry latent ringspot virus</i> (SLSRV)
	Sin asignar	
BROMOVIRIDAE	<i>Alfavirus</i>	<i>Alfalfa mosaic virus</i> (AMV)
	<i>Cucumovirus</i>	<i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV)
	<i>Ilavirus</i>	<i>Grapevine line pattern virus</i> (GLPV) <i>Grapevine angular mosaic virus</i> (GAMoV)
TOMBUSVIRIDAE	<i>Carmovirus</i>	<i>Carnation mottle virus</i> (CarMV)
	<i>Necrovirus</i>	<i>Tobacco necrosis virus D</i> (TNV-D)
	<i>Tombusvirus</i>	<i>Grapevine Alegrian latent virus</i> (GALV) <i>Petunia asteroid Mosaic virus</i> (PAMV)
TYMOVIRIDAE	<i>Marafivirus</i>	<i>Grapevine ateroid mosaic associated-virus</i> (GAMAV) <i>Grapevine red globe virus</i> (GRGV) <i>Grapevine syrah virus 1</i> (GSV-1) <i>Blackberry virus S</i> (BISV)
	<i>Maculavirus</i>	<i>Grapevine fleck virus</i> (GFkV)
Sin asignar	Sin asignar	<i>Grapevine Ajinashika virus</i> (GAgV) <i>Grapevine stunt virus</i> (GSV) <i>Grapevine labile rod-shaped virus</i> (GLRSV)

Tabla I: Clasificación de los virus que afectan a las vides

De estos virus cobran importancia los agentes etiológicos de la enfermedad del “Enrollamiento de la vid”.

1.1.6 - Enfermedad del enrollamiento de la vid

El “Enrollamiento de la vid” es la enfermedad vírica más extendida en el mundo que causa grandes pérdidas económicas, como consecuencia de la caída del rendimiento del fruto, debido a la caída del peso de las bayas y notable disminución del grado azucarino (Martínez et al., 2009; Mannini, et al. 2012). Esta enfermedad se estima que causa una pérdida de entre 25000 y 40000 dólares por hectárea de viñedos de 25 años de vida útil (Atalah et al., 2012). Los síntomas varían según el tipo de cultivar y las diferentes combinaciones virales que los afectan (Martelli et al., 2012). Esta enfermedad puede ser causada por una infección simple o mixta de virus (Maninni et al 2012), siendo el virus predominante *Grapevine leafroll-associated virus -3* (GLRaV-3)(Martelli, 2009), el cual se asocia en la infección mixta con otros, que pueden ser *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), *Grapevine leafroll associated virus-1 y 2* (GLRaV-1 y GRAV-2) , *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine virus B* (GVB), *Grapevine rupestris stem pitting associated virus* (GRPSaV) y *Grapevine fleck virus* (GFkV) (Fiore et al. , 2009; Komorowska, 2014). Estos virus asociados a esta enfermedad son los clasificados dentro de la familia *Closteroviridae*.

1.1.7 - Mecanismo de infección y transmisión de GLRaV-3 y sus virus asociados a las *Grapevine leafroll disease*.

Los *Leafroll virus* se pueden transmitir y persistir a través del material propagativo como vides injertadas, tallos o ramas con brotes vegetativos o portainjertos, en función de las prácticas culturales de cada región productora (Krüger et al., 2015). El segundo tipo de transmisión es a través de insectos de pequeña escala y cochinillas, principalmente por *Planococcus ficus*, *Pseudococcus longispinus* y *Pseudococcus calceoridae*, los cuales adquieren y transmiten al virus a través de la alimentación de los fluidos floemáticos (Almeida et al., 2013).

1.1.8 - Síntomas característicos de las enfermedades causadas por *Leafroll virus*

La severidad de los síntomas por infección con GLRaV y sus virus asociados varía en función de la ubicación geográfica del cultivo, el clima, el tipo de suelo, la combinación de virus y las prácticas vitícolas de cada región (Maree et al., 2013). La mayoría de los síntomas causados por la enfermedad suelen aparecer en el verano tardío (enero - febrero en Argentina), o tempranamente en otoño (Nuredin et al., 2007). Los cultivares de uvas tintas son más afectados que los cultivares de uvas blancas, solo en algunas de estas se han observado los síntomas. Por ejemplo, *Vitis vinífera* cv chardonnay presenta un pronunciado enrollamiento de las hojas durante el período de cosecha, mientras que las variedades cv. Thompson Seedless y Suavignon Blanc no lo muestran o lo hacen de una manera muy sutil (Maree et al., 2013). El síntoma característico y predominante es la clorosis foliar y el enrollamiento, engrosado y endurecimiento de las hojas (Almeida et al., 2013). Se produce disminución del grado azucarino de la baya en un 5% aproximadamente (Digaro et al., 2009) en conjunto con una disminución del peso (Cabaleiro, 2009) y un notable descenso en el número de racimos por vid entre un 14 y 20% (Alabi et al., 2016)

1.1.9 - Caracterización de los mecanismos de defensa en una planta

El ataque de patógenos es una condición desfavorable que activa una serie de mecanismos de defensa cuyo fin es detener, aminorar o contrarrestar la infección.

Las plantas pueden poseer mecanismos constitutivos de defensa que proveen, de forma pasiva, resistencia contra patógenos. Los mecanismos de resistencia constitutiva, o también llamados mecanismos de defensa "preformada", se pueden dividir en mecanismos de defensa estructurales constitutivos, como por ejemplo la presencia de capas gruesas de cutícula, presencia de tricomas, deposición de ceras, entre otros; y mecanismos de defensa químicos constitutivos, tales como la acumulación de compuestos tóxicos en las células vegetales (Osbourn, 1996).

A diferencia de la defensa constitutiva, los mecanismos inducidos de defensa, también llamados como resistencia inducida, se activan solamente como una respuesta al ataque de un patógeno. La resistencia inducida es un mecanismo activo de defensa que involucra cambios claros en el metabolismo provocado por la expresión diferencial de genes. Por lo tanto, para que ocurra la inducción de la defensa, es necesaria la mediación de sistemas de reconocimiento específico, mediante los cuales la planta reconoce la presencia del patógeno (Stange, 2006; Zheng y Xinnian, 2013).

A las interacciones de las plantas con microorganismos patógenos se les denomina incompatibles o compatibles, dependiendo del éxito de la infección. En las primeras, la planta bloquea al patógeno inmediatamente después de su reconocimiento, evitando la infección; mientras que en las segundas, el microorganismo suprime o retrasa el reconocimiento de éste por la planta, permitiendo la infección. La interacción entre un patógeno particular y una especie de planta es específica e invariable (Nelson y Citovsky, 2005; Hustchenson, 1998).

La primera expresión de resistencia "inducida" por el patógeno es la reacción contra subsecuentes infecciones de patógenos, independientemente si son virus, bacterias u hongos. Esta respuesta es llamada "resistencia sistémica adquirida" (RSA) (Zheng y Xinnian, 2013) y se refiere a distintas vías de transducción de señales que juegan un rol importante en la habilidad metabólica de la planta. La reacción de hipersensibilidad (RH), se considera como la máxima expresión de resistencia de las plantas al ataque por patógenos. Durante la RH las células que rodean el sitio donde penetró el patógeno entran en apoptosis con la intención de detener su avance y la infección. Así, la RH forma parte de los mecanismos de defensa estructural inducida de la planta. La muerte de células que ocurre durante la RH se considera una muerte celular programada (MCP) (Noman et al., 2020).

Las proteínas relacionadas con la patogénesis, también llamada proteínas PR (por sus siglas en inglés, Related Proteins), son un grupo variable que se acumulan en las plantas después y durante la infección con patógenos. Las proteínas PR se identificaron inicialmente en plantas de "tabaco" durante la interacción con el virus del mosaico del tabaco. Estas se caracterizan por su bajo peso molecular, resistencia a las proteasas, de localización extracelular y con valores de pH extremos (Bogdanove, 2002)

Dentro de las defensas bioquímicas inducidas, las fitoalexinas (metabolitos secundarios) son los productos finales de la expresión génica. Por lo tanto, se puede considerar que los cambios

existentes en su perfil químico son una de las principales características en cuanto a la interacción de la planta con el patógeno y el medio ambiente, es decir, la descripción metabólica es una herramienta que ayuda a revelar la compleja naturaleza interactiva entre las redes metabólicas de la planta y sus respuestas a los factores ambientales como la incidencia de patógenos (Oliveira et al., 2018). Estos compuestos normalmente se encuentran en niveles basales muy bajos en las plantas sanas, pero su acumulación se incrementa dramáticamente después del ataque de un patógeno. Se acumulan en grandes cantidades tanto en el sitio de penetración como en las células y tejidos adyacentes a las células que reaccionan con la HR. La producción de fitoalexinas se ha correlacionado con la resistencia a patógenos y se asocia con la inducción de una serie de genes que codifican para enzimas específicas, responsables de su síntesis (Kuc, 1995)

Los virus son patógenos intracelulares obligados que requieren que las células hospedadoras vivas se repliquen para poder diseminarse en la planta infectada. Las células hospedadoras infectadas son capaces de desencadenar cambios moleculares durante las interacciones compatibles con el fin de restringir las infecciones por virus. Durante las interacciones compatibles, los virus superan el sistema inmune de las plantas y secuestran los procesos celulares del huésped para establecer infecciones activas alterando el ciclo celular de la planta. Esta interferencia en el huésped conduce a una amplia gama de defectos de desarrollo y fisiológicos de la planta (Martelli, 2014).

La diferenciación bioquímica que existe entre una planta de vid infectada y una sana ocurre en diferentes niveles de sus procesos metabólicos. La vía biosintética de los fenilpropanoides en la "vid" es una de las más estudiadas y relacionadas con los mecanismos de defensa de las plantas ante una amplia gama de factores de estrés (bióticos y abióticos), y es responsable de la síntesis de un gran número de compuestos fenólicos (Jeandet, 2015).

Dentro de estos compuestos del hospedero, los metabolitos secundarios tales como los terpenos y las fitoalexinas, derivados ambos de la ruta metabólica del ácido shikímico, se han definido como un conjunto de defensas versátiles de la planta contra agentes patógenos, aunque su mecanismo de acción es todavía desconocido (Dixon, 2002).

En una investigación de Li et al., (2015) se ha identificado genética y bioquímicamente que la fitoalexina sesquiterpénica, capsidiol 3-acetato, está directamente involucrada en la defensa de *Nicotiana benthamiana* (de la misma familia que el Tabaco) contra el *Potato virus X* de la papa (Virus del mosaico rugoso o simplemente PVX). Además, se identificó que los genes NbTPS1 y NbEAH fueron fuertemente inducidos por la infección por PVX. La actividad enzimática y la evidencia genética indicaron que ambos genes estaban implicados en la biosíntesis inducida por PVX del 3-acetato de capsidiol, y la acumulación de éste en la planta infectada fue parcialmente regulada por el receptor de señalización del ácido jasmónico. Estos hallazgos demuestran que la planta utiliza su metabolismo secundario basal como mecanismo para defenderse contra el ataque de virus incluso en especies sensibles.

El estudio anteriormente citado, no sólo es importante para explicar cómo se activa genéticamente el mecanismo de defensa inducido mediante la síntesis de fitoalexinas de la planta ante la infección, sino que prueba claramente que ante una infección vírica la planta altera su metabolismo secundario basal, sintetizando un nuevo metabolito o aumentando la

concentración de uno existente que resulta en un marcador distintivo de la presencia de la enfermedad.

Se ha demostrado en numerosas investigaciones que plantas del género *Vitis* sometidas a diversos tipos de estrés, responden sintetizando, mediante su metabolismo secundario, resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) o derivados de éste (Fig. 5), como piceido, pterostilbeno, piceatannol o viniferinas (Timperio et al., 2012). Principalmente se ha demostrado su presencia como fitoalexinas frente a infecciones de tipo fúngica, específicamente cuando se encuentra infectada con *Botrytis cinera*, *Plasmopara viticola* y *Tricoderma viridae* (Jeandet et al., 1995; Calderón et al., 1993)

El efecto negativo de las infecciones virales sobre el desarrollo fisiológico de las plantas ha sido reportado por numerosas investigaciones. En una investigación realizada en plantas de papa (*Solanum tuberosum* L.) infectadas con *Potato leafroll virus* y *Potato virus Y* se observó que los brotes incrementaban los niveles de clorofila, proteínas solubles y azúcares totales (Jing et al., 2013), como consecuencia de los cambios fisiológicos que provoca la carga viral en los distintos órganos de la planta. También cambios fisiológicos y bioquímicos del mismo tipo han sido informados en plantas infectadas con *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) (Radwan et al., 2007).

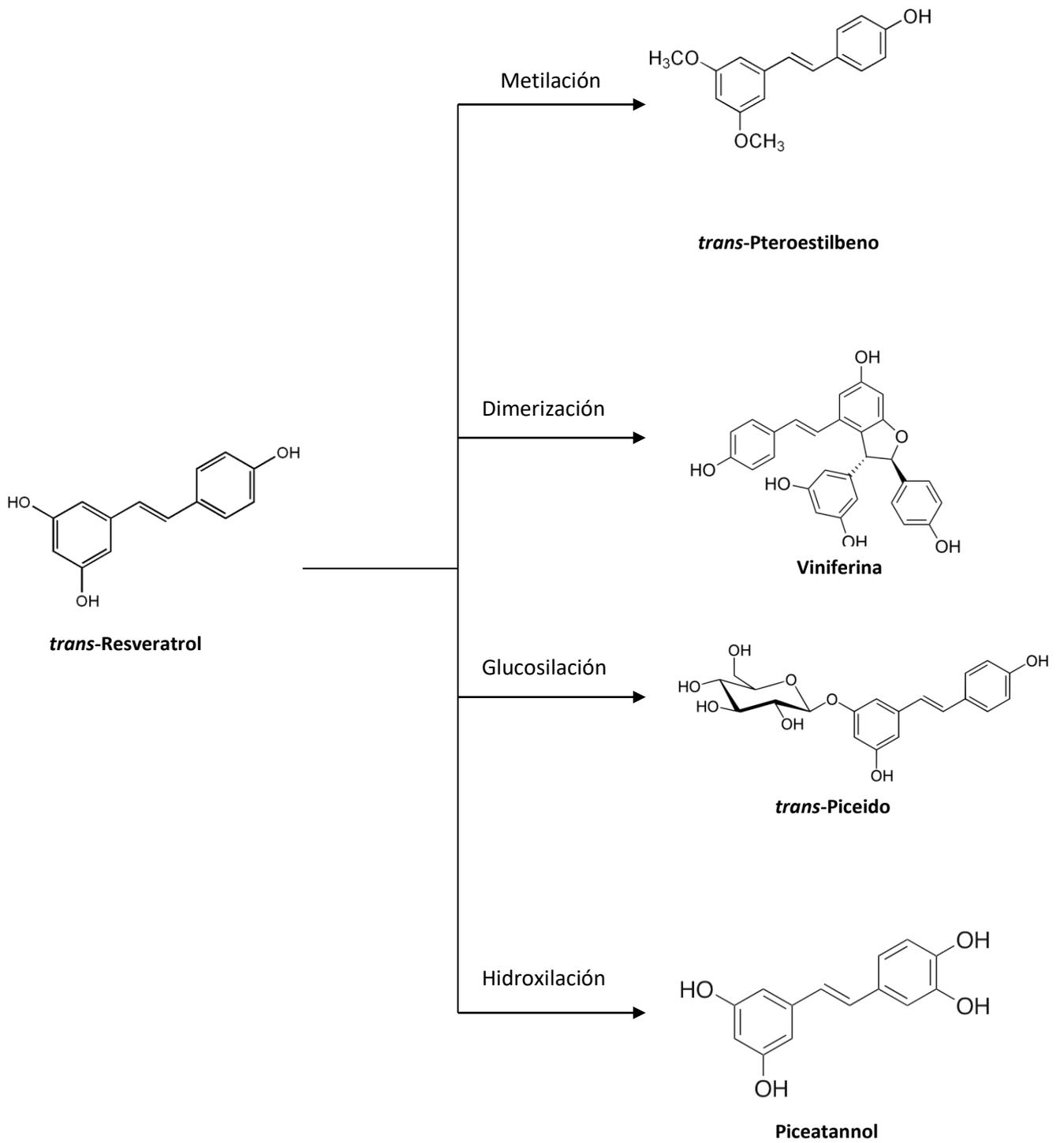


Figura 5: Destinos principales de la molécula de resveratrol dentro de las células

1.2 - Hipótesis de trabajo

Se plantea como hipótesis que el metabolismo primario y secundario de las plantas de *V. vinifera* L. cv Flame seedless se ve afectado como consecuencia de diferentes infecciones, incluso con la infección con GLRaV-1, 2 y 3, y/o con sus virus asociados. Estos cambios derivan en un aumento o disminución en las cantidades sintetizadas de metabolitos primarios y secundarios involucrados en el proceso infectivo, además del incremento de una o más fitoalexinas características del género *Vitaceae*.

1.3 - OBJETIVOS

1.3.1 - *Objetivo general*

- Analizar los cambios metabólicos en plantas de *V. vinifera* L. cv Flame seedless infectadas con *Grapevine leafroll virus*.

1.3.2 - *Objetivos específicos*

- **Objetivo 1:** Determinar la cantidad de resveratrol, sintetizado como defensa sistémica adquirida, en respuesta a la infección por parte de las plantas infectadas con GLRaV-3, GLRaV-3 y GLRaV-2 y GLRaV-3 y GVA.
- **Objetivo 2:** Cuantificar la acumulación de α -tocoferol, compuestos antioxidantes (en términos de fenoles totales), azúcares solubles, proteínas solubles, prolina y glicina betaina, como consecuencia de la infección viral.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

El diseño experimental se basó en dos instancias de análisis a fin de responder a los dos objetivos específicos planteados.

En una primera instancia, se procedió al análisis fitoquímico, a fin de elucidar si existía incremento en la síntesis de *trans*-Resveratrol por las plantas en respuesta a la infección, actuando como una fitoalexina.

En una segunda etapa, se analizaron los cambios fisiológicos-metabólicos producto también de la infección, a través de la cuantificación de los metabolitos principales involucrados en dichos cambios, como azúcares solubles, proteínas solubles, prolina, glicina betaína, compuestos antioxidantes y polifenoles totales.

2.1 - MATERIALES

2.1.1 – Equipamiento de uso general

Espectrofotómetro UV-V SHIMATZU 1800 (China). Balanza Analítica SARTORIUS PRACTUS 224-1FAR, Centrifuga marca Presvac modelo DCS-16-RV, Rotavapor BUCCI 461 Waterbatch, Sonicador TEC LAB 200W, 35-37 Khz., dos bombas de Vacío por sistema de agua reciclable de ¼ HP.

2.1.2 - Equipo utilizado para Cromatografía líquida de alta resolución- Espectrometría de masas (HPLC-MS)

Se utilizó un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-MS) marca Waters, que cuenta con bomba cuaternaria (modelo Acquity H-Class), automoestreador y un detector de espectroscopía de masas triple cuadrupolo con fuente de ionización por electro spray (ESI)(modelo Xevo TQ-S Micro). Se utilizó una columna C₁₈ (2.1 x 100) mm marca Waters, modelo BEH, con tamaño de partícula 1.7 µm.

2.1.3- Solventes y reactivos

Los solventes grado puro marca SINTORGAN se destilaron antes de su utilización, los de grado analítico y para cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), también marca SINTORGAN, se utilizaron tal como fueron adquiridos al proveedor. El agua ultra pura (Sintorgan), fue provista por SALPER S.A, sede Mendoza.

Los reactivos y compuestos estándares usados se mencionan a continuación: β-caroteno (Supelco, China), α-tocoferol (Supelco, USA), 2,2 difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH, Sigma, China), ácido gálico (Sigma, USA), ácido cítrico (Supelco, USA), D-(-)-fructosa (Sigma Aldrich, USA), Coomassie brilliant G-250 (Biopack, Argentina), seroalbúmina bovina (Roth, Alemania), ninhidrina (Merck, USA), ácido sulfosalicílico (Biopack, Argentina), L-prolina (Biopack, Argentina), glicina betaína (Sigma, USA), 1,2-dicloroetano (PHYW, Alemania), *o*-fenantrolina (Anhedra, USA), reactivo de Folin-Ciocalteu (Biopack, Alemania), carbonato de sodio anhidro (Biopack, Argentina), fenol (Biopack, Argentina), ácido fosfórico 85 % (Tetrahedron, Argentina), ioduro de potasio (Anhedra, Argentina), iodo resublimado (Biopack, Argentina). TROLOX (Calbiochem, Alemania), *trans*-resveratrol (Sigma, USA).

2.1.4- Características de los cultivos y ubicación geográfica

El cultivo consiste en cuatro plantas de la especie vegetal *Vitis vinifera* L. cv Flame Seedless (Vitaceae), pertenecientes a la finca "El dorado", ubicada en el departamento de Albardón, provincia de San Juan. Se tomaron muestras de sarmientos completos, que incluyen hojas, nudos, zarcillos y pecíolos, las cuales fueron recolectadas y almacenadas a 5°C para su transporte al laboratorio y almacenadas hasta su procesamiento a la misma temperatura.

Ubicación: Departamento de Albardón, Provincia de San Juan. Coordenadas: 31°27'15.3"Sur 68°34'01.7" Oeste

Hectáreas cultivadas: 21 ha., 1000 plantas/ha, distribuidas en:

- Variedad Flame Seedless (variedad tinta): 13 has. Destino: Consumo interno en fresco y pasas.
- Sultanina (variedad blanca): 8 has. Destino: pasas

Tipo de Riego: por goteo

El cultivo de las dos variedades de uva de mesa y el manejo agronómico incluyen las mismas características de suelo, riego, plan de fertilización y manejo cultural.

Hectáreas estudiadas en este trabajo: 4 ha. de uva tipo Flame.

Dentro de las hectáreas implantadas con plantas de "vid" (Fig. 6), se seleccionaron dos áreas para tomar las muestras. Una zona afectada por las infecciones virales (muestras de plantas enfermas), y otra zona que no parecía, a simple vista, estar afectada por ninguna enfermedad (zona de muestra de planta sana).

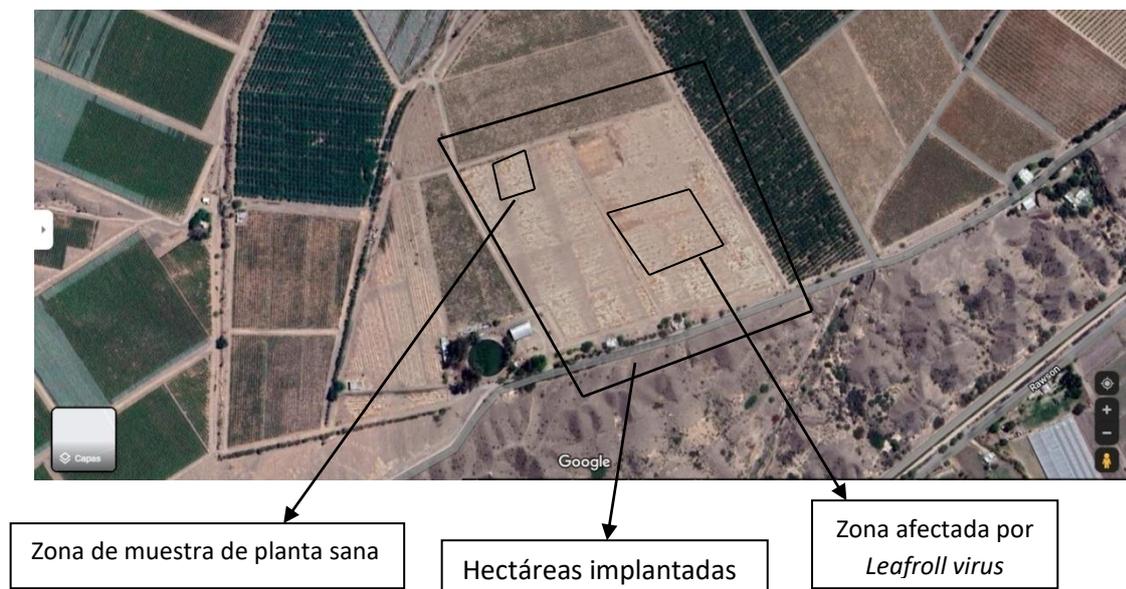


Figura 6: Foto satelital de la finca y ubicación geográfica de los cultivos (Google Maps, 2021)

2.1.5- Selección del material vegetal

A fin de responder a los objetivos de este trabajo, se seleccionaron por observación visual aquellas plantas que presentaban síntomas característicos de la enfermedad del enrollamiento de la “vid” (Fig. 7): enrollamiento de las hojas, crecimientos anómalos, frutos de baja calidad y hojas con clorosis foliar (Alameida et al., 2013).

Esta toma de muestras fue realizada durante el mes de febrero del año 2018. A partir de nueve plantas marcadas con síntomas de la enfermedad, y tres sin síntomas aparentes (control negativo), se recolectaron, de cada una de ellas, sarmientos completos.

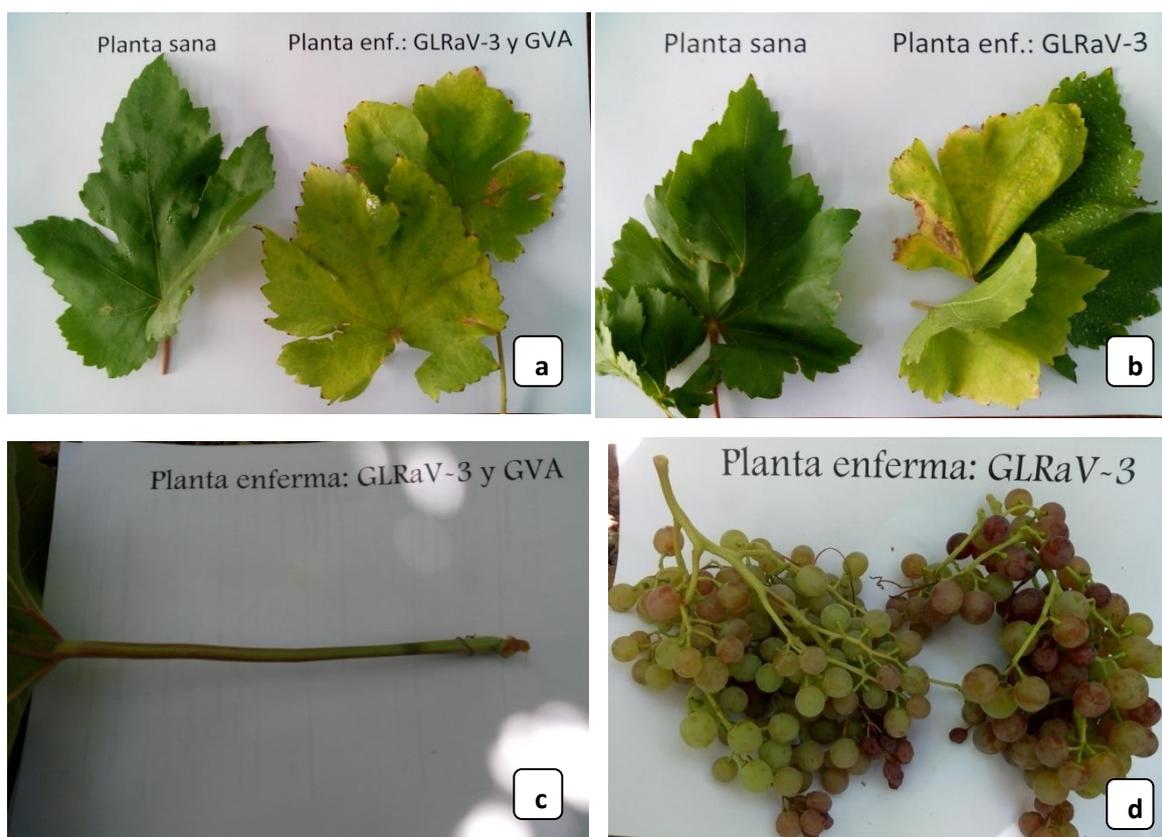


Figura 7: fotografías de hojas y bayas de vides infectadas con *Leafroll virus*. **a** y **b**: comparación de hojas sanas y hojas cloróticas, **c**: crecimiento anómalo de un peciolo, **d**: bayas decoloradas y de pobre crecimiento.

2.1.6 - Identificación de los virus

Como ya se explicó en la introducción, la enfermedad del enrollamiento de la “vid”, se debe a una infección viral por *Grapevine leafroll virus*- 1, 2 y 3 (GLRaV-1, GLRaV-2 y GLRaV-3); por tanto, fue necesario identificar los virus que afectaban a cada planta. Esto fue llevado a cabo por el laboratorio de la Estación Experimental Agropecuaria del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (EEA-INTA), sede Mendoza, mediante la metodología de RT-PCR.

Brevemente: sobre muestras de hojas y tallos se realizó extracción de RNA total, a partir de él se realizaron las retro transcripciones con hexámeros y amplificaron luego individualmente

para cada virus. A partir de los resultados obtenidos de todas las plantas seleccionadas (Tabla 2), se seleccionaron tres plantas identificadas como F10483, F144714 y F154920, que estaban infectadas con un único virus (GLRaV-3), con dos virus (GLRaV-3 y GVA) y con tres virus (GLRaV-2, GLRaV-3 y GVA). Como control negativo se seleccionó la planta identificada como F10461; en la cual no se había identificado la presencia de virus alguno.

2.1.7 - Preparación de las muestras a analizar

Según se explicó anteriormente, una vez seleccionadas las plantas para trabajar (una sana y tres enfermas), se procedió a la toma de las muestras para analizar en la finca. De cada planta seleccionada, se tomaron muestras de sarmiento completo, incluyendo hojas, nudos, entrenudos, zarcillos y peciolo, que pesaban entre 1,5 Kg a 2,5 Kg, los cuales se cortaron de las plantas con tijera de poda. Inmediatamente, se procedió a colocarlos en bolsas estériles, debidamente identificadas como PE1V (planta infectada con único virus, GLRaV-3), PE2V (planta infectada con dos virus, GLRaV-3 y GVA), PE3V (planta infectada con tres virus, GLRaV-2, GLRaV-3 y GVA) y PS (planta sana). Posteriormente, se colocaron en hieleras a -10 C⁰ para su traslado inmediato al laboratorio. Una vez en el laboratorio, se procedió a separar de cada muestra las hojas destinadas a los diferentes ensayos previstos, tanto fisiológicos como de extracción de metabolitos secundarios.

Código de planta marcada	GLRaV-1	GLRaV-2	GLRaV-3	GFLV	ArMV	GfKV	GSyV-1	RSPaV	GVA
F-10461	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F-10472	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F-11496	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F-14915	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F-10483	-	-	+	-	-	-	-	-	-
F-144714	-	-	+	-	-	-	-	-	+
F-11474	-	-	-	-	-	-	-	-	+
F-11485	-	-	-	-	-	-	-	-	+
F-154920	-	+	+	-	-	-	-	-	+
F-135012	-	-	+	-	-	-	-	-	+
F-154718	-	-	+	-	-	-	-	-	-
F-12509	-	-	+	-	-	-	-	-	+

Tabla 2: Códigos de plantas muestreadas y virus testeados en cada una de ellas. Abreviaturas: GLRaV: *Grapevine leafroll virus-1,2* y 3, GFLV: *Grapevine fanleaf virus*, ArMV: *Arabic mosaic virus*, GfKV: *Grapevine fleck virus*, GSyV-I: *Grapevine syrah virus - I*, RSPaV: *Rupestris stem pitting virus* y GVA: *Grapevine virus A*.

2.2 - MÉTODOS

2.2.1 - Extracción, identificación y cuantificación de *trans*-Resveratrol

Metodología de extracción del metabolito objetivo

El análisis fitoquímico se realizó mediante el método descrito por Harborne (1998), con algunas modificaciones. De cada una de las muestras de plantas enfermas, se fragmentaron, con tijeras de podar, 1 kg de hojas y se colocaron a macerar en 3 L de etanol al 96% durante siete días en oscuridad. Luego se filtró la solución con vacío a través de papel Whatman N°40. Este proceso se repitió tres veces sobre cada muestra. Una vez obtenidos los macerados de cada planta, se unieron y concentraron a presión reducida hasta obtener entre 40 y 50 g de un extracto de consistencia viscosa y color marrón-oscuro. Cada una de las muestras concentradas se las disolvió con metanol (Fig. 8) de forma de obtener una solución a una concentración que corresponde al 20% m/v de cada uno de ellos. Luego, se realizó un proceso de partición con éter de petróleo (3 x 100 ml), de forma de extraer lípidos y clorofilas, a fin de evitar interferencias en los ensayos posteriores. Las fracciones metanólicas y de éter de petróleo resultantes se concentraron en rotavapor a presión reducida, hasta sequedad y se conservaron en freezer a -10 C° para su posterior análisis por HPLC-MS.

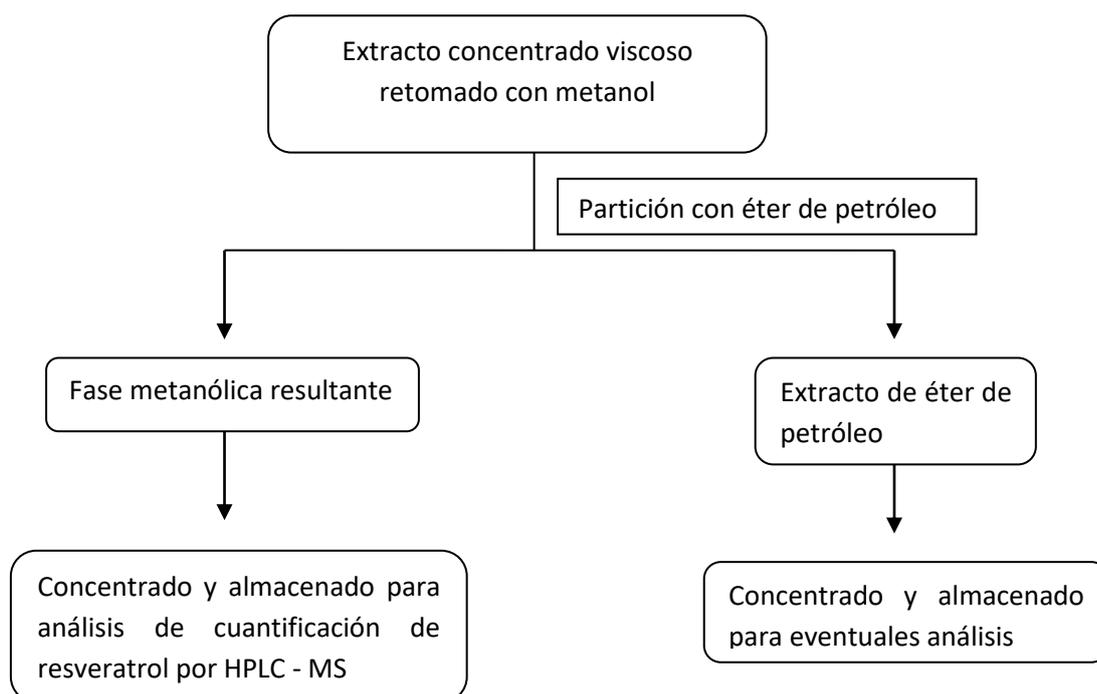


Figura 8: Proceso de extracción de resveratrol.

2.2.2 Condiciones de análisis de los extractos por HPLC-MS

La cuantificación se llevó a cabo siguiendo el método de Ramalingam y Tag Ko (2016), con algunas modificaciones, según se describe a continuación. Se retomaron, en metanol grado HPLC, los extractos de forma de obtener una concentración de cada uno de ellos de 10 mg/ml. Se procedió a su inyección en el equipo de HPLC-MS a fin de evaluar los parámetros que mejor se ajustaran a la separación cromatográfica. También se decidió evaluar, en base a las referencias bibliográficas, la presencia de piceido y viniferina en los extractos. Tomando como referencia a Guerrero et al, (2020), se determinaron las condiciones de corrida que se describen a continuación:

Metodología HPLC:

- Fase móvil: Solvente A: agua/ácido fórmico 0,1 % v/v, Solvente B: metanol/ácido fórmico 0,1 % v/v en proporción 50/50, modo isocrático.
- Temperatura de columna: 30 °C.
- Temperatura de muestras: 15 °C
- Volumen de inyección: 3 µl
- Flujo: 0,2 ml/min

Metodología de Masas:

- Polaridad: modo negativo
- Voltaje capilar: 3,0 kV
- Voltaje de cono: 50 V
- Temperatura de fuente: 150 °C
- Temperatura de desolvatación: 350 °C
- Gas de desolvatación (nitrógeno): 650 L/h
- Gas de colisión: argón
- Modo SCAN (MS): rango de masas entre 200 y 800 Dalton
- Modo MRM (Multiple Reaction Monitoring) (MS-MS), las transiciones utilizadas:

Compuesto	Transición	Energía cono (V)	Energía de colisión (V)
Resveratrol	227.0 > 143	52	26
	227.0 > 185	52	18
Piceido	389.0 > 159.0	45	35
	389.0 > 227.0	45	15
Viniferina	453.0 > 225.0	65	20
	453.0 > 347.0	65	20
	453.0 > 359.0	65	20

Tabla 3: Transiciones utilizadas para evaluar los compuestos de interés por HPLC-MS

En el caso de *trans*-resveratrol se infundió en el detector una solución estándar de concentración 5 ppm y se pusieron a punto las transiciones para el mismo a través del software Intellistart (Tabla 3). En el caso de las moléculas de piceído y viniferina, las transiciones utilizadas para la búsqueda de estos compuestos se tomaron de la bibliografía (Guerrero et al, 2020). Teniendo en cuenta, que estos compuestos podrían estar presentes en los extractos, se procedió a evaluar dichas transiciones en los cromatogramas correspondientes, tanto en modo SCAN como MRM.

2.2.2.1 Curva de calibración por HPLC-MS

Para proceder a la cuantificación, se realizó una curva de calibración con *trans*-resveratrol estándar. Se partió de una solución madre de 0,5 mg/ml para realizar seis diluciones sucesivas (de 0,075 a 0,00625 mg/ml). Cada concentración se inyectó bajo las condiciones mencionadas anteriormente. En el anexo I se encuentran los cromatogramas en modo MRM de cada una de las concentraciones inyectadas, cada una se inyectó por duplicado y se realizó la curva de calibración graficando área bajo la curva vs. Concentración (Tabla 4 y Fig. 9).

Conc. (mg/ml)	Área promedio	T _r (min)
0,075	892075	1,50
0,05	633072	1,50
0,025	341352	1,50
0,0125	129105	1,50
0,00625	76451	1,51
0,003125	43896	1,50

Tabla 4: Datos de curva de calibración de *trans*-resveratrol realizada por HPLC-MS

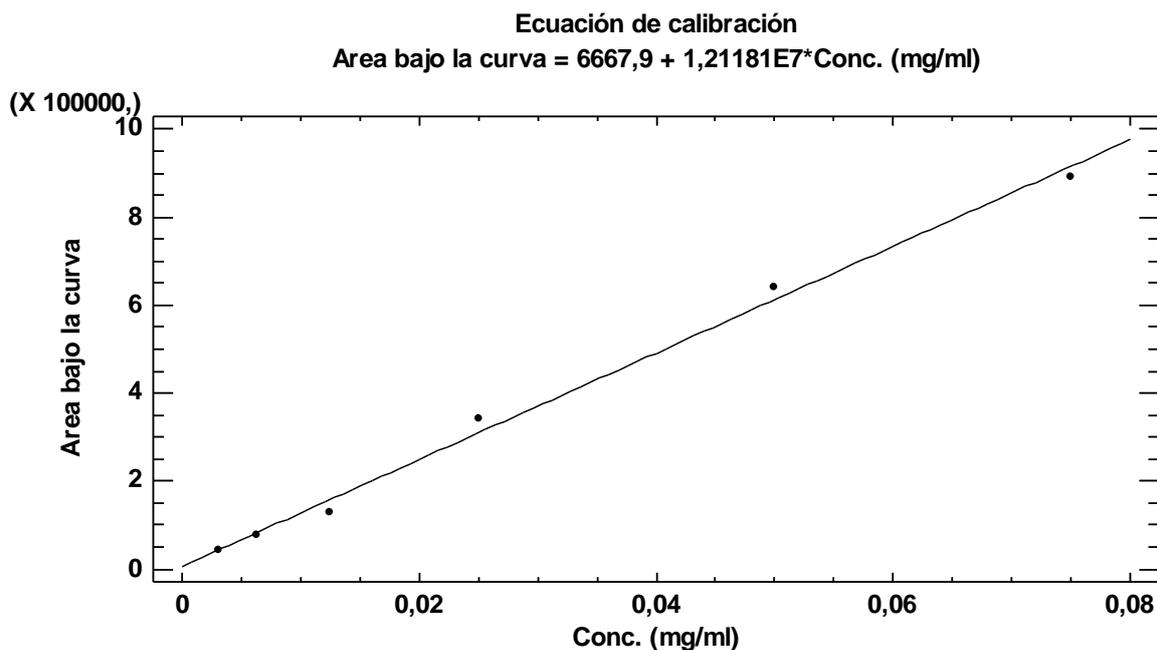


Figura 9: Curva de calibración de *trans*-resveratrol realizada mediante HPLC-MS

2.2.3 Determinación de cambios en metabolitos primarios y secundarios involucrados en la respuesta a la infección viral.

Es menester destacar que para cada uno de los ensayos que se presentan a continuación se utilizaron las cuatro plantas explicitadas al comienzo del capítulo, una planta sana (PS), utilizada como control negativo, y las tres plantas enfermas (PE1V, PE2V y PE3V), con uno, dos y tres virus respectivamente. Para cada una de ellas las extracciones y determinaciones de metabolitos también se realizaron por triplicado con el fin de obtener un promedio de cada una de las mediciones.

2.2.3.1 Determinación de α -tocoferol

El contenido de α -tocoferol en las muestras se analizó mediante la reacción de Emmerie-Engel, descrita por Rosenberg (1992). Esta reacción se basa en la reducción del ion Fe^{2+} a Fe^{3+} por acción del tocoferol, el cual con *o*-fenantrolina forma un complejo de color rojo intenso (Hanks y Beaver, 1944).

Para desarrollar el presente ensayo se utilizaron las siguientes soluciones:

- Solución de α -tocoferol estándar al 2 % en etanol absoluto.
- Solución de *o*-fenantrolina al 0,12 % en n-propanol.
- Solución de cloruro férrico hexahidratado al 0,12 % p/v, en etanol absoluto.
- Solución de β -caroteno estándar al 0,04 % m/v en xileno.

A continuación, se describe brevemente este ensayo:

El proceso de extracción y determinación se llevó a cabo de acuerdo con el método descrito por Martinek (1968). Se usaron 5 g de hoja fresca y fragmentada, que se extrajeron con 30 ml de xileno en un sonicador durante 15 min a temperatura ambiente. Luego se filtró, a fin de separar las hojas del extracto de xileno, a través de papel de filtro Whatman N° 40, protegiendo permanentemente de la luz. Se procedió inmediatamente a la determinación para evitar oxidaciones del analito extraído. Se continúa trabajando con las soluciones obtenidas.

Se procedió a trabajar con 1 ml de filtrado, cuya absorbancia se leyó a 460 nm (Abs. muestra 460 nm). Luego, se le agregó 1 ml de solución de FeCl₃ al 0,12 % en etanol absoluto y 0,5 ml de O-fenantrolina al 0,1 % en etanol absoluto, se agitó en vórtex por 30 seg, luego se centrifugó por 5 min a 350 rpm y finalmente se leyó la absorbancia de la capa superior a 600 nm (Abs. muestra a 600 nm). Se utiliza una solución de α-tocoferol estándar en xileno a una concentración de 0,5 mg/ml como estándar, tratándola de la misma forma antes mencionada, para leer así la absorbancia a 600 nm (Abs. Sol Estándar 600 nm). La concentración de α-tocoferol en la cada muestra se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Cant. De } \alpha\text{-tocoferol } (\mu\text{g/mg PF}) = \frac{\text{Abs muestra 600 nm} - (0,373 \times \text{Abs muestra 460 nm})}{\text{Abs. Sol. Estándar 600 nm}}$$

El factor de multiplicación 0,373 deriva de calcular la absorbancia de la solución de β-caroteno estándar (0,4 mg/100 ml en xileno) a 600 Y 460 nm. Se debe calcular para cada espectrofotómetro en particular, donde se realizarán las determinaciones de α-tocoferol (Martinek, 1964):

$$\frac{\text{Absorbancia a 600 nm}}{\text{Absorbancia a 460 nm}} = \text{factor}$$

2.2.3.2 Determinación de capacidad antioxidante

- Extracción de metabolitos

Se fragmentaron, con tijera de podar, 50 g de hoja fresca de cada muestra y se colocaron a macerar en 200 ml de metanol durante 24 h en oscuridad. Luego se filtró el macerado a presión reducida a través de papel de filtro Whatman N°40, separando hojas del sobrenadante, para luego concentrarlo a presión reducida a 40 °C, y el residuo se redisolvió en 5 ml de metanol.

- Ensayo:

Se estudió la actividad antioxidante total de la fracción metanólica obtenida, empleando DPPH. Para ello, se siguió el método propuesto por Bakhta et al (2016). Este método se basa en la

medición de la habilidad de compuestos antioxidantes para reducir el radical DPPH, el cual se encuentra disuelto en metanol, a partir de la disminución en la absorbancia, en función del tiempo (Prior y col., 2005). Esta reacción produce un cambio de color en la solución y se monitorea espectrofotométricamente a 517 nm. Alícuotas de 250 µl de cada extracto se diluyeron con 0,5 ml de metanol y a continuación se le incorporó 1 ml de la solución de DPPH (6×10^{-6} M). Luego de 20min, a temperatura de 25 °C, se determinó la disminución de la absorbancia a 517 nm, en oscuridad. Como control positivo se utilizó ácido ascórbico al 1% en metanol. El porcentaje de inhibición del radical DPPH se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = (A_0 - A_1 / A_0) \times 100$$

Donde, A_0 es la absorbancia del control positivo y A_1 indica la absorbancia de la muestra.

Utilizando como base una curva de calibración realizada con TROLOX, el resultado de la capacidad antioxidante se expresa como microgramos de TROLOX por mililitro de extracto de cada planta, cuantificando de esta forma la cantidad de antioxidante necesaria para disminuir en un 50% la concentración inicial de DPPH (EC_{50}).

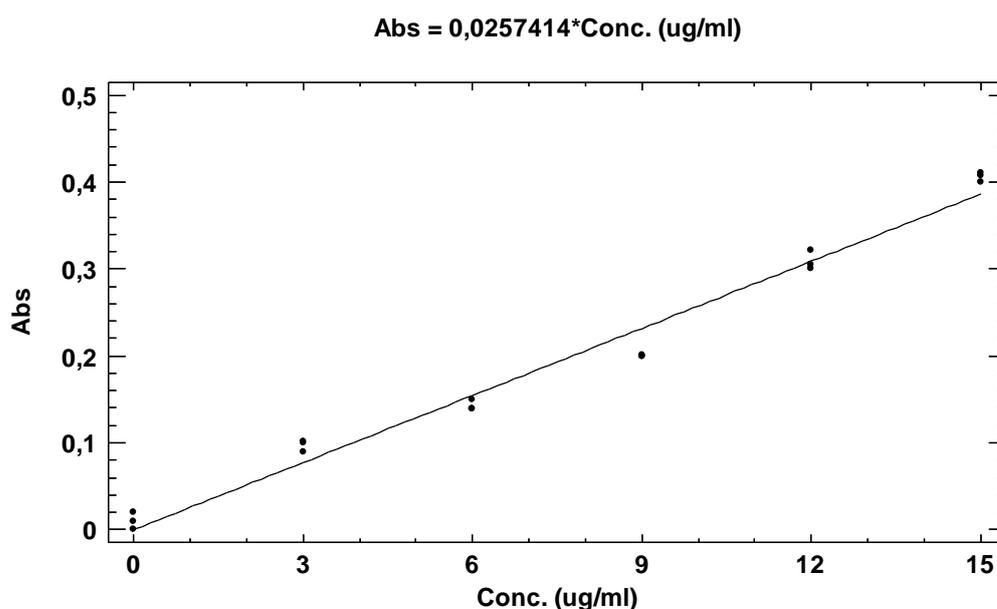


Figura 10: Curva de calibración realizada con TROLOX, mediante espectrofotometría UV

2.2.3.3 Determinación de fenoles totales

La determinación de compuestos fenólicos totales se realizó en extractos metanólicos, siguiendo el método informado por Nguyen y Niemeyer (2008). Este ensayo se basa en la determinación de fenoles en una muestra, tomando como referencia una curva de calibración realizada previamente con un antioxidante estándar, como ácido gálico o resveratrol, por ejemplo.

- Curva de calibración

Se realizó una curva de calibración, utilizando como patrón una solución de ácido gálico de 1 mg/ml (solución madre). Se traspasaron a seis tubos de ensayo las cantidades necesarias de solución madre para obtener una concentración final de 50, 100, 150, 200 y 250 µg/ml. Luego, a cada uno de ellos se les agregó 450 µl de agua grado HPLC, 250 µl del reactivo de Folin-Ciocalteu y 1,25 ml de Na₂CO₃ al 20% en agua. De esta forma se obtuvieron seis soluciones que representaban a cada uno de los seis puntos de la curva de calibración (Figura 11). Se leyó la absorbancia a 735 nm de cada una de ellas, para luego graficar esta absorbancia vs. concentración de ácido gálico. Cada punto de la curva se ensayó por triplicado.

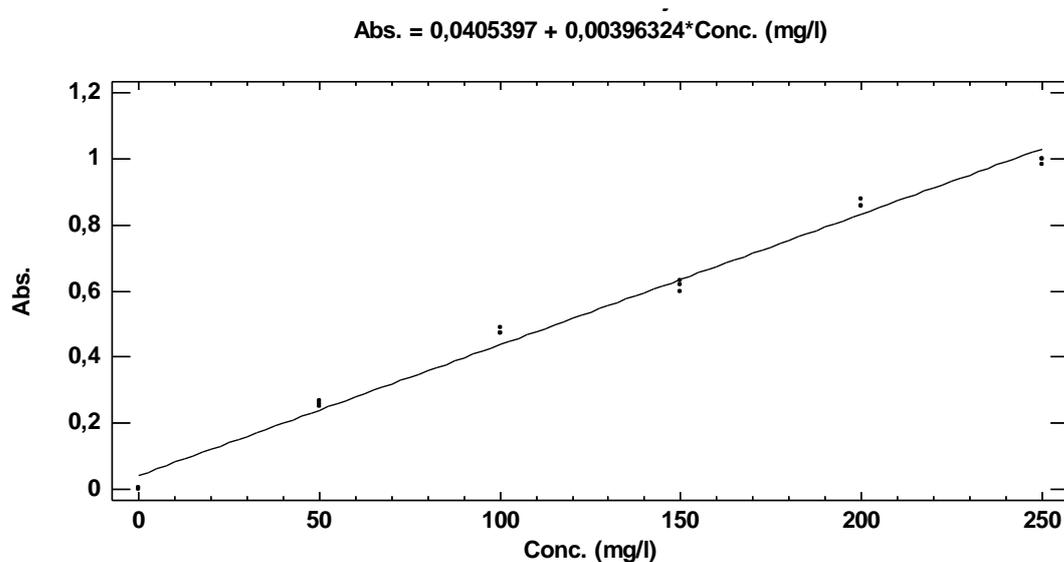


Figura 11: Curva de calibración para ácido gálico realizada mediante espectrofotometría UV.

- Determinación de fenoles totales en las muestras

En un tubo de ensayo se mezclaron 50 µl de extracto de hoja de cada una de las plantas enfermas, obtenidos en el ensayo de capacidad antioxidante, 450 µl de agua grado HPLC, 250 µl del Reactivo de Folin-Ciocalteu y 1,25 ml de solución acuosa al 20% de Na₂CO₃, se mezclaron por cinco segundos en vórtex y se dejaron incubar a temperatura ambiente durante 30 min. Luego se midió la absorbancia de las muestras a 735 nm.

2.2.3.4 Determinación de azúcares solubles

Para determinar el contenido de azúcares totales se siguió el método de Jinkang et al (2019), con algunas modificaciones, también conocido como método del fenol-sulfúrico. El principio de la determinación analítica se basa en la formación de furfural (aldosa) y de 5-hidroxi metilfurfural (cetosa) en medio fuertemente ácido deshidratante, condición proporcionada por el ácido sulfúrico. El derivado formado entra en proceso de protonación/desprotonación por acción del ácido debido al exceso de fenol, presente en el

medio, formándose compuestos de color amarillo/café que presentan máximos de absorbancia a 490 nm. Cabe aclarar que esta técnica es limitante solo para azúcares o compuestos que forman este tipo de derivados de furfural.

Para expresar el contenido de azúcares en las hojas se utiliza como referencia una curva de calibración realizada con D-fructosa estándar.

- Curva de calibración

Se utilizó como patrón una solución madre de D-fructosa de 1 mg/ml, de la cual se tomaron siete alícuotas de 100, 200, 300 500, 700, 800 y 900 μ l, que se traspasaron a siete tubos de ensayo y se agregaron 1 ml de solución acuosa de fenol al 5% (preparado *in situ*) y 5 ml de ácido sulfúrico concentrado. Se mezcló inmediatamente en vórtex vigorosamente por 1 min. Una vez enfriada la mezcla a temperatura ambiente y en oscuridad, se procedió a leer su absorbancia a 490 nm para graficar concentración de D-fructosa vs. Abs. (Fig. 12). Cada muestra se ensayó por triplicado.

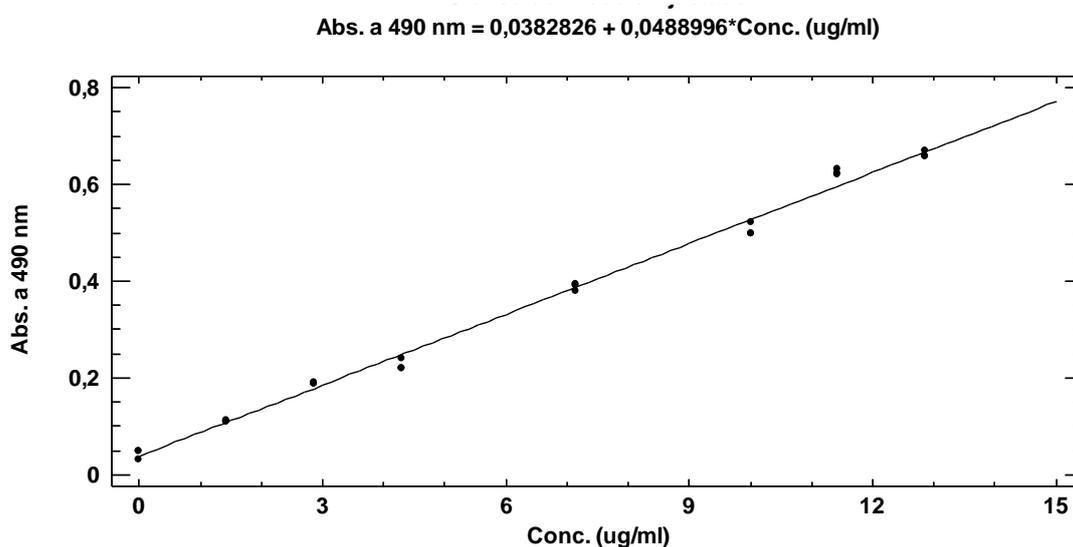


Figura 12: Curva de calibración para D-fructosa realizada mediante el método del fenol-sulfúrico.

- Extracción y determinación de azúcares solubles en las muestras

Para extraer los azúcares solubles se siguió el método propuesto por Martin et al (2000), con algunas modificaciones. Se colocó a macerar 1 g de hoja seca y picada con mortero, en 10 ml de etanol al 96%. Luego se filtró al vacío a través de papel Whatman N^o40, lavando el sólido una vez más con etanol; así se obtuvieron 20 ml de solución final. Se procedió a evaluar 1ml de la solución obtenida, de la misma forma que el estándar de D-fructosa. Los resultados se expresaron como miligramos de fructosa por gramo de peso seco de hoja.

2.2.3.5 Determinación de proteínas solubles

- Preparación de reactivos:

Buffer Fosfato de potasio-EDTA para extracción de proteínas: se pesaron 2,3135 g de KH_2PO_4 (PM 136,09 g/mol), 7,53 g de $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (PM 228,23 g/mol), 0,1861g de EDTA-Na_2 (PM

372,23 g/mol), luego se disolvieron con 350 ml de agua destilada fría. Se agitó hasta disolución completa y se ajustó a pH 7,5 con HCl 0,1 M, enrasando finalmente a 500 ml con agua destilada fría. La solución se conservó a 4 °C hasta su utilización.

Buffer fosfato de sodio para curva de calibración: se pesaron 1,2444g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (PM 173,98 g/mol) y 0,4042 g de Na_2HPO_4 (PM 141,96 g/mol), se disolvieron en 80 ml de agua destilada fría, agitando hasta disolución completa. Luego se ajustó a pH 6,8 con HCl 0,1 M y se enrasó a 100 ml con agua destilada fría. La solución se conservó a 4 °C hasta su utilización.

Reactivo de Bradford: Se pesaron 100 mg de azul brillante de Coomassie G-250, se disolvieron en 50 ml de etanol 95%, agitando fuertemente y en oscuridad, luego se agregaron 100 ml de ácido fosfórico 85%, también agitando fuertemente y en oscuridad. Posteriormente se completó a 1,0 l con agua destilada fría y agitó por una hora, se filtró dos veces a presión reducida a través de papel de filtro Whatman N°40 y almacenó en frasco ámbar debidamente rotulado a 4 °C.

- Curva de calibración:

Se realizó con seis concentraciones diferentes del patrón elegido: seroalbumina bovina (BSA) de concentración 1,45 mg/ml. Se prepararon las mezclas siguiendo el procedimiento que se presenta a continuación: se colocaron en seis tubos de ensayo 0, 20, 40, 60, 80 y 100 μl de solución madre, luego se les agregó 2 ml de buffer fosfato de sodio, se homogeneizó con vórtex por 10 seg. Se agregaron 800 μL de reactivo de Bradford y finalmente se taparon y homogeneizaron suavemente cinco veces para evitar la formación de espuma, dejando en reposo por 15 min. Finalmente se leyó la absorbancia a 590 nm y 450nm. Utilizando como blanco el buffer fosfato de sodio, se construyó la gráfica: concentración de proteína vs. Abs. 590nm / Abs. 450nm (Fig. 13).

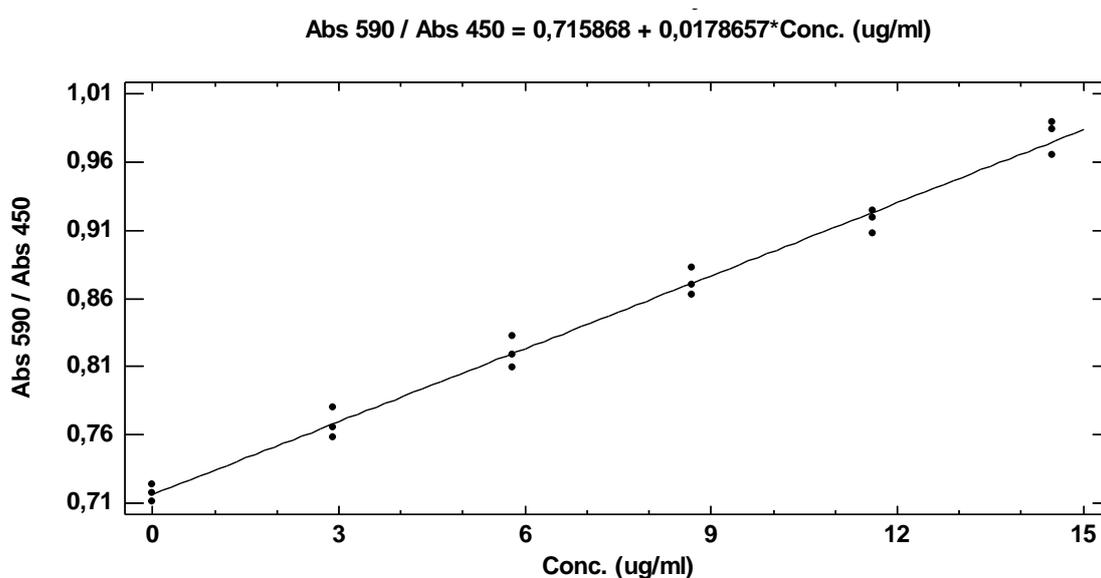


Figura 13: Curva de calibrado para BSA patrón realizada mediante el método de Bradford.

- Extracción y determinación del contenido de proteínas solubles en las muestras

La extracción se realizó siguiendo el método de Deutscher (1990), con 10 ml de buffer fosfato de potasio sobre 1 g de hoja fresca picada finamente con tijera de podar, y homogenizando por 2 min en vórtex. Se incubó durante 1 h en baño de hielo en agitador horizontal y luego se centrifugó 30 min a 6000 rpm y 4°C para separar el sobrenadante (extracto proteico), para la determinación inmediata del contenido de proteína. Se tomaron 200 µl del extracto y se procedió a tratar de igual forma que el estándar (BSA) para realizar la curva de calibración. Los resultados se expresaron como miligramo de proteína por gramo de peso fresco de hoja.

2.2.3.6 Determinación de prolina

La determinación del aminoácido prolina se realizó mediante el método de Bates et al, 1973. Se fundamenta en que la ninhidrina es un agente oxidante fuerte que efectúa la descarboxilación de los aminoácidos, el amoníaco así formado reacciona con una segunda molécula de ninhidrina protonada para producir un pigmento, del cual solo el átomo de nitrógeno pertenece al aminoácido. Esta es una metodología específica para determinar el contenido de prolina.

Para desarrollar el presente ensayo se utilizaron las siguientes soluciones:

Ninhidrina 0,1 M: se pesaron 156,1 mg de ninhidrina y disolvió en 3,75 ml de ácido acético glacial a 40 °C, luego de disolución completa se adicionaron 2,5 ml de ácido fosfórico 3 M.

Ácido sulfosalicílico 3%: se pesaron 1,5 g de ácido sulfosalicílico y se disolvieron en 50 ml de agua destilada, conservando a 40 °C.

Patrón de prolina 40 µM: se pesaron 2,3 mg de L-prolina que se disolvieron a un volumen de 500 ml con la solución de ácido sulfosalicílico.

- Curva de calibración:

Se realiza utilizando un estándar de L-prolina preparado previamente y evaluando cada nivel de concentración por triplicado. El procedimiento consistió en colocar en un tubo de ensayo con tapa, el volumen respectivo de ácido sulfosalicílico 3% y las distintas cantidades del patrón para cada punto deseado en la curva. Luego se adicionó 1 ml de ácido acético y 1 ml de la solución de ninhidrina, agitando vigorosamente por 10 s en vórtex, protegiendo de la luz en todo momento. Los tubos de ensayo se colocaron en gradilla y se llevaron a ebullición en baño María por 1 h, luego se enfrió bruscamente sobre un baño de hielo-agua durante 20 s. Una vez que se alcanzó la temperatura ambiente se le adicionó a cada tubo 3 ml de tolueno, se agito vigorosamente una vez más y luego se colectó la fase orgánica (fase superior) y se leyó su absorbancia a 520 nm, utilizando como blanco tolueno. Se construyó la gráfica concentración de prolina (µg/ml) versus absorbancia a 520 nm.

- Extracción y determinación del contenido de prolina en las muestras:

Se pesó 1 g de hoja picada fresca de cada muestra en 20 ml de ácido sulfosalicílico al 3 % y se sometió a sonicación por 1 h, luego se centrifugó a 6000 rpm por 30 min a 10 °C. Se tomó 1 ml

del sobrenadante, tratando luego de igual forma que lo descrito en la curva de calibración. El contenido del analito se expresó como μg prolina/ g de hoja fresca.

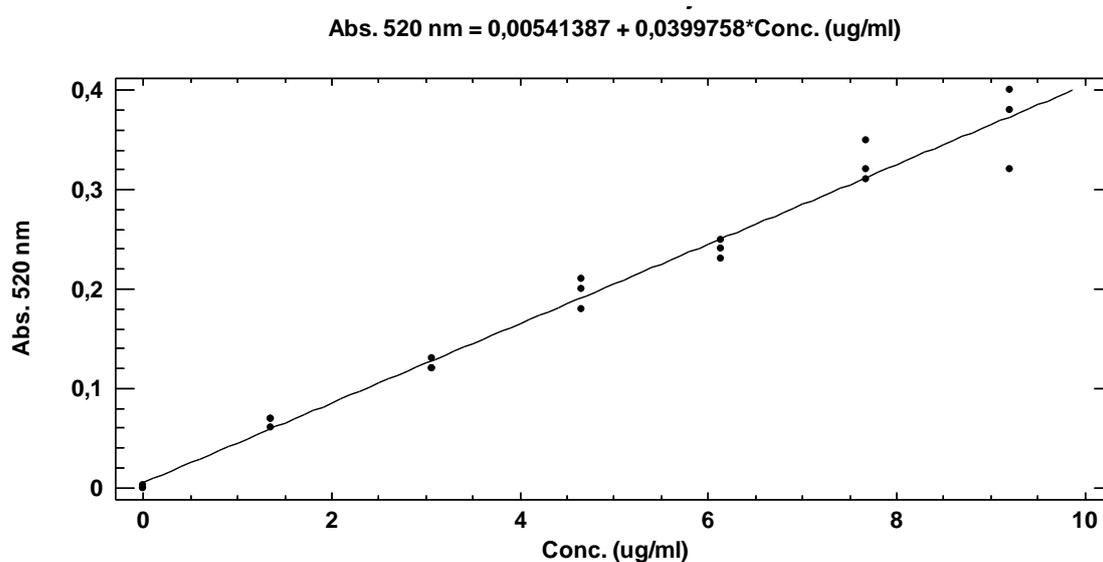


Figura 14: Curva de calibración para L-prolina realizada mediante el método de Bates, et al.

2.2.3.7 Determinación de glicina-betaína

El ensayo se fundamenta en la cristalización que sufren los complejos de amonio cuaternario a pH bajos y su posible cuantificación mediante espectrofotometría.

- Curva de calibración

Se realiza utilizando un patrón de glicina-betaína disuelto en H_2SO_4 2N en concentraciones que van desde 50 a 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, evaluando cada una por triplicado. Cada concentración se diluyó en una proporción 1:1, con H_2SO_4 2N, luego se tomaron 0,5 ml de esta solución, se mezclaron con 0,2 ml de una solución de KI-I_2 en agua y agitaron suavemente en un vórtex para luego almacenar a 0°C por 16 h. Una vez cumplidas, manteniendo a 0°C , se procedió a centrifugar a 10000 rpm durante 15 min y retirar el sobrenadante. Los cristales sedimentados en el fondo del tubo se diluyeron con 9 ml de 1,2-dicloroetano, mezclando vigorosamente y dejando reposar durante 2,5 horas para finalmente leer su absorbancia a 365 nm. Se construyó la gráfica que relaciona concentración de glicina-betaína ($\mu\text{g}/\text{ml}$) vs. absorbancia a 365 nm.

- Extracción y determinación de glicina betaína:

Tanto la extracción como la cuantificación se realizaron siguiendo el método descrito por Grieven y Grattan, 1983: se colocaron a macerar 5 g de hoja seca de cada muestra, de cada una de las plantas, en 10 ml de H_2SO_4 2N por 48 h en oscuridad. Se procede a evaluar 1 ml del sobrenadante, de igual forma que se realizó para el estándar. El resultado se expresó como microgramos de glicina-betaína por gramo de peso seco de hoja.

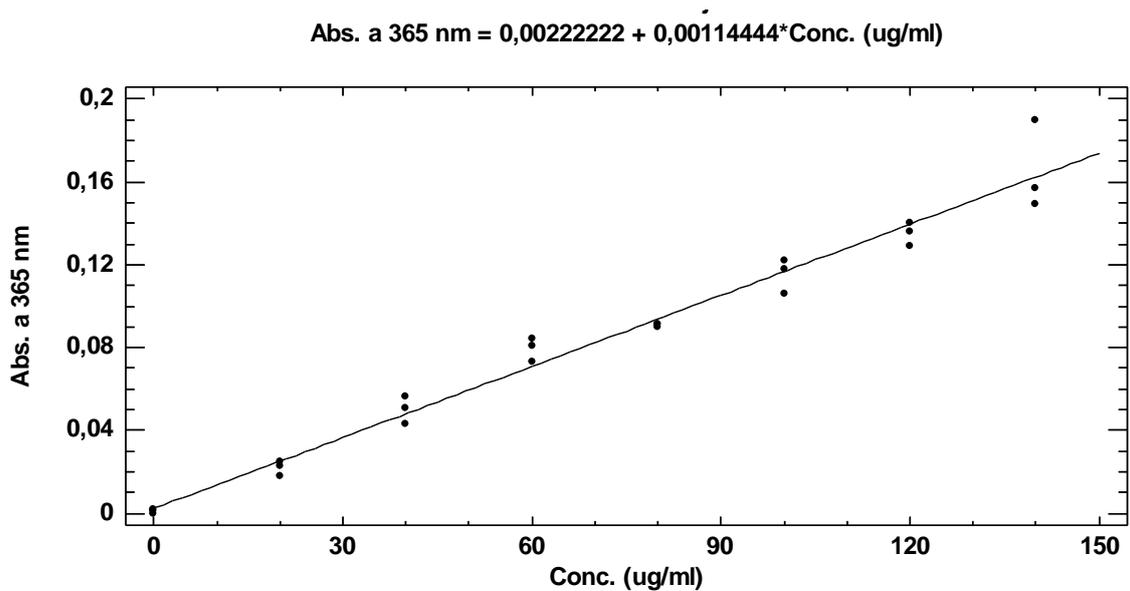


Figura 15: Curva de calibración para glicina betaína en el método de Grieven y Grattan.

2.2.4 Análisis estadístico

La significación de las diferencias entre los grupos de control y experimentales se analizó mediante la prueba t de Student de dos colas de varianza desigual. Los datos con $p \leq 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. Se tomaron tres muestras diferentes para cada tratamiento y se analizaron dos veces.

Los coeficientes de regresión, las correlaciones y los diagramas de caja y curvas de calibración se obtuvieron utilizando el paquete de software Sigma Plot 10.0 (Systat; Chicago, IL, EE. UU.). Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) para revelar diferencias entre plantas sanas y enfermas en los parámetros estudiados. Las diferencias entre las medias fueron reveladas por análisis de Duncan ($P < 0.05$), realizados con la estadística IBMSPSS 16.0 (SPSS).

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 -RESULTADOS

3.1.1-IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE RESVERATROL COMO FITOALEXINA SINTETIZADA EN RESPUESTA A LA INFECCION VIRAL

En el Anexo I se muestran los cromatogramas de resveratrol estándar a diferentes concentraciones utilizados para realizar la curva de calibrado, junto con los cromatogramas de la planta sana (PS) y las plantas enfermas (PE1V, PE2V y PE3V), donde se evalúa la concentración de resveratrol en cada una de ellas. Se puede observar que la señal con tiempo de retención (tR) de $1,50 \pm 0,1$ min corresponde a la molécula de resveratrol de acuerdo con los cromatogramas obtenidos al infundir el estándar de resveratrol (Anexo I), y los espectros de masas obtenidos en modo SCAN (Anexo III). Además, esto se corrobora con la revisión bibliográfica (Guerrero et al, 2020; Ramalingam y Tag Ko, 2016).

En la Tabla 5, se muestran las concentraciones de resveratrol en los extractos etanólicos de las plantas enfermas (PE1V, PE2V y PE3V) en comparación a la PS, incluyendo su contenido (mg) en 10 ml de extracto y en g de hoja.

Los resultados determinan un aumento en la producción de resveratrol en las plantas infectadas, con respecto a la planta sana, lo que indicaría que este compuesto es sintetizado en respuesta a la infección viral. La cantidad de resveratrol en las plantas enfermas se ve incrementada en más de un 200 % con respecto a la planta sana.

Planta (muestra)	Área bajo la curva (cromatograma MRM)	Conc. (mg/ml)	mg en 10 ml de extracto	ug/g de hoja
PE1V	210665	0,01712	0,1712	0,3424
PE2V	186803	0,01512	0,1512	0,3024
PE3V	177969	0,01438	0,1438	0,2876
PS	64834	0,00488	0,0488	0,0977

Tabla 5: Contenido de resveratrol en hojas de plantas sana y enfermas

En el Anexo II se muestran las corridas cromatográficas que se utilizaron para identificar resveratrol y sus derivados, específicamente piceido y viniferina, mediante las transiciones expuesta en la Tabla 3 del capítulo Materiales y métodos. Se puede afirmar que resveratrol posee un tiempo de retención (tR) de $1,50 \pm 0,1$ min porque coincide con el tR del compuesto estándar (Anexo I). A pesar de que para piceido y viniferina se estimaron los tR, usando las transiciones según bibliografía, $1,30 \pm 0,1$ min para piceido y $1,57 \pm 0,1$ min para viniferina no podemos asegurar la presencia de estos derivados porque no se contaba con los estándares correspondientes para infundir.

En el Anexo III se muestran los cromatogramas modo SCAN de extractos, conjuntamente con los espectros de masas correspondientes a las señales más importantes. A pesar de que en algunos extractos aparecen señales con tR similares a piceido ($1,28 \pm 0,3$ min) y para viniferina ($1,52 \pm 0,1$ min), las señales en los espectros de masas no se corresponden para piceido (M-1 = 389) y para viniferina (M-1 = 453).

3.1.2-DETERMINACION DE METABOLITOS PRIMARIOS Y SECUNDARIOS INVOLUCRADOS EN LA RESPUESTA A LA INFECCION VIRAL

Determinación de α -tocoferol

Se observó que las plantas infectadas con uno, dos y tres virus (PE1V, PE2V y PE3V) presentaban, con respecto a la planta sana (PS), un incremento promedio de α -tocoferol del 50, 53,57 y 89,28 % respectivamente, representando, en términos globales, las plantas infectadas un incremento promedio del 64,28 % con respecto a la planta control.

Tabla 6: contenido de α -tocoferol en plantas sanas y enfermas

	PS	PE1V	PE2V	PE3V
Tocoferol (ug/gPF)	541,3 \pm 0,23	812 \pm 0,00	831,3 \pm 0,03	1024,7 \pm 0,03
Incremento con respecto a PS	-	50%	53,57%	89,28%

Nota : \pm SD: Desv. estándar de tres repeticiones

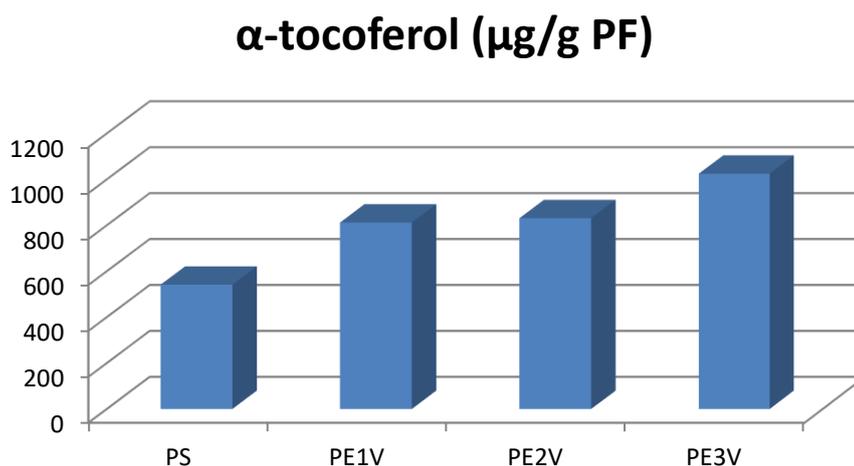


Figura 16: Cantidad de α -tocoferol en muestras de planta sana y plantas enfermas

Tabla 7: relación estadística entre muestras

	PS/PE1V	PS/PE2V	PS/PE3V	PE1V/PE2V	PE1V/PE3V	PE2V/PE3V
Nivel p	***	***	***	ns	ns	ns

Nota: *** - $p < 0,001$, ** - $p < 0,01$, * - $p < 0,05$, ns – no significativo.

Determinación de la actividad antioxidante

En la Tabla 8 se observa que la EC_{50} de las plantas infectadas es menor respecto de la PS. Esto significa que la actividad antioxidante para el 50% se obtiene a una menor concentración de extracto, supuestamente debido a una mayor cantidad de compuestos antioxidantes. El EC_{50} se calcula en base a la ecuación matemática que representa a la línea de tendencia que arroja la repetición del ensayo mencionado anteriormente, dicho parámetro indica la concentración efectiva necesaria para inhibir el 50% del radical libre DPPH.

La disminución de la EC_{50} fue de un 24,03 % para PE1V, un 22,92 % para PE2V y un 26,74 % para PE3V en comparación a la PS. Así, demostramos que la cantidad de compuestos antioxidantes presentes en las muestras de plantas enfermas era mayor que en la planta sana, en términos globales este incremento representó el 24,56 %.

Tabla 8: EC_{50} en plantas sanas y enfermas

	PS	PE1V	PE2V	PE3V
EC_{50} (ug/ml PF)	11,93 ± 0,31	9,06 ± 0,98	9,19 ± 1,45	8,74 ± 0,83
Disminución con respecto a PS	-	24,03 %	22,92 %	26,74 %

Nota ± SD: Desv. estándar de tres repeticiones

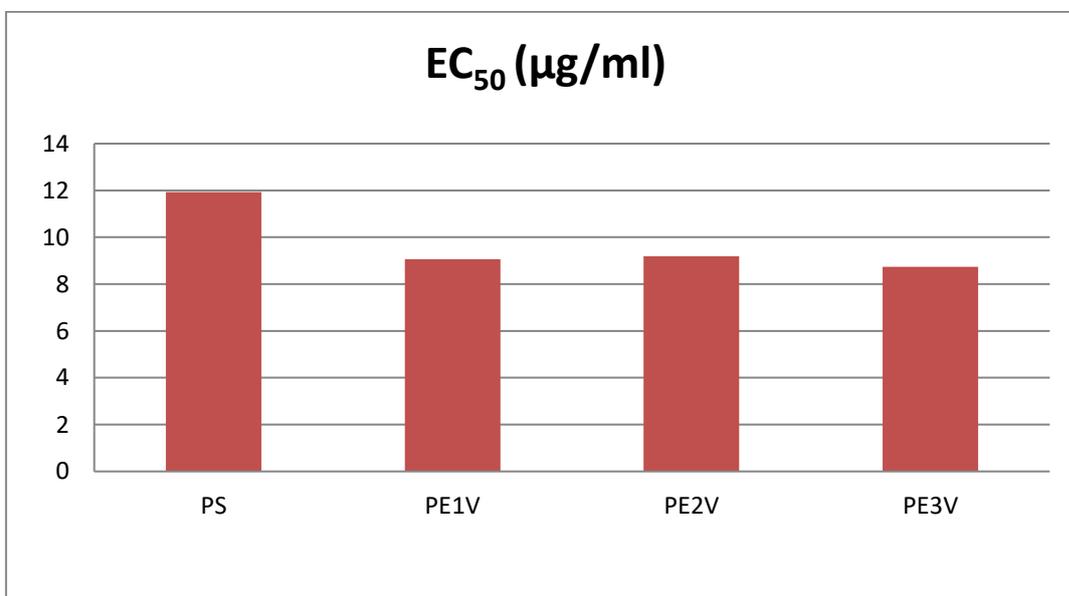


Figura 17: EC_{50} en muestras de planta sana y plantas enfermas

Tabla 9: relación estadística entre muestras

	PS/PE1V	PS/PE2V	PS/PE3V	PE1V/PE2V	PE1V/PE3V	PE2V/PE3V
Nivel p	***	***	**	ns	ns	ns

Nota: *** - $p < 0,001$, ** - $p < 0,01$, * - $p < 0,05$, ns – no significativo.

Determinación de fenoles totales

Se determinó que el contenido de polifenoles totales estaba aumentado en las plantas enfermas (PE1V, PE2V y PE3V) con respecto a la PS, en un 39,12% para PE1V, 48,29% para PE2V y 45,75% para PE3V. El incremento promedio fue del 44,38% con respecto a la PS.

Tabla10: contenido de fenoles totales en plantas sanas y enfermas

	PS	PE1V	PE2V	PE3V
Fenoles totales (mg/g WD)	57,84 ± 2,55	84,47 ± 5,19	85,77 ± 5,22	84,3 ± 3,08
Incremento con respecto a PS	-	39,12 %	48,29 %	45,75 %

Nota: ± SD: Desv. estándar de tres repeticiones

Fenoles totales (mg/g DW)

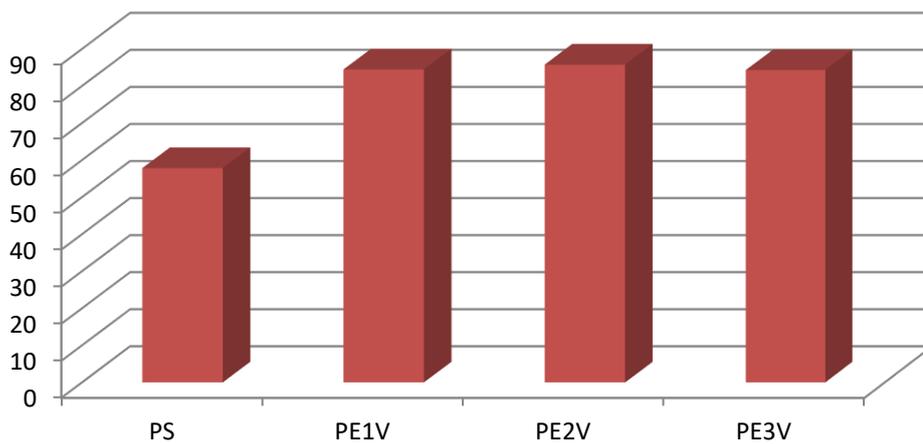


Figura 18: Contenido de polifenoles totales en muestras de planta sana y plantas enfermas

Tabla 11: relación estadística entre muestras

	PS/PE1V	PS/PE2V	PS/PE3V	PE1V/PE2V	PE1V/PE3V	PE2V/PE3V
Nivel p	***	***	***	ns	ns	ns

Nota: *** - $p < 0,001$, ** - $p < 0,01$, * - $p < 0,05$, ns – no significativo.

Determinación de azúcares solubles

El contenido de azúcares solubles de las plantas enfermas (PE1V, PE2V y PE3V) estaba incrementado en un 23,33, 23,34 y 24,22 % para las plantas enfermas con uno, dos y tres virus respectivamente en comparación con la planta sana. El incremento promedio de azúcares para las plantas enfermas con respecto a la planta sana representó un 23,59 %.

Tabla 12: contenido de fructosa en plantas sanas y enfermas

	PS	PE1V	PE2V	PE3V
Fructosa (mg/g WD)	21,44 ± 0,8	26,42 ± 0,6	26,42 ± 0,2	26,63 ± 1,2
Incremento con respecto a PS	-	23,33 %	23,4 %	24,22 %

Nota: ± SD: Desv. estándar de tres repeticiones

Azúcares solubles (mg/g DW)

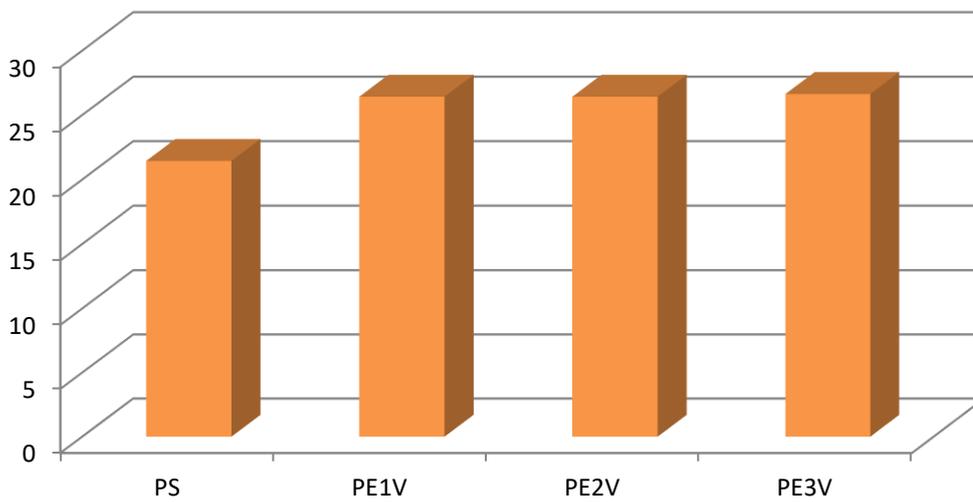


Figura 19: Contenido de azúcares solubles en muestras de planta sana y plantas enfermas

Tabla 13: relación estadística entre muestras

	PS/PE1V	PS/PE2V	PS/PE3V	PE1V/PE2V	PE1V/PE3V	PE2V/PE3V
Nivel p	**	**	***	ns	ns	ns

Nota : *** - $p < 0,001$, ** - $p < 0,01$, * - $p < 0,05$, ns – no significativo.

Determinación de proteínas solubles

Se observó que las plantas infectadas con uno (PE1V), dos (PE2V) y tres (PE3V) virus presentaban un incremento de proteínas solubles, expresados como mg de BSA por peso fresco de hoja, del 24,55 %, 15,29 % y 19,53 % con respecto a la planta sana. Esto en términos globales representa que las plantas enfermas presentan un incremento promedio del 19,79% con respecto a la planta control (PS).

Tabla 13: contenido de proteínas solubles en planta sana y plantas enfermas

	PS	PE1V	PE2V	PE3V
Proteínas solubles totales (mg/g PF)	71,08 ± 7,73	88,73 ± 6,53	81,95 ± 1,95	85,17 ± 8,48
Incremento con respecto a PS	-	24,55 %	15,29 %	19,53 %

Nota: ± SD: Desv. estándar de tres repeticiones

Proteínas solubles (mg/g PF)

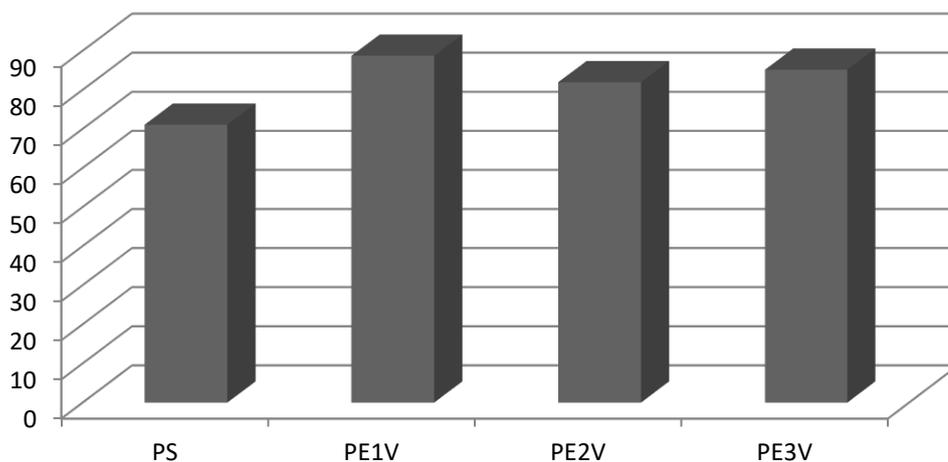


Figura 20: Contenido de proteínas solubles en muestras de planta sana y plantas enfermas

Tabla14: relación estadística entre muestras

	PS/PE1V	PS/PE2V	PS/PE3V	PE1V/PE2V	PE1V/PE3V	PE2V/PE3V
Nivel p	***	**	***	ns	ns	ns

Nota: *** - $p < 0,001$, ** - $p < 0,01$, * - $p < 0,05$, ns – no significativo.

Determinación de prolina

El contenido de prolina de las plantas enfermas estaba incrementado en un 40,55; 50,85 y 41,38 % para las plantas infectadas con uno, dos y tres virus respectivamente en comparación con la planta sana. El incremento promedio de prolina con respecto a la planta sana representó un 44,26% más.

Tabla15: contenido de prolina en planta sana y plantas enfermas

	PS	PE1V	PE2V	PE3V
L-prolina (mg/g WD)	2,58 ± 0,42	3,63 ± 0,19	3,90 ± 0,29	3,65 ± 41,38
Incremento con respecto a PS	-	40,55 %	50,85 %	41,38 %

Nota: ± SD: Desv. estándar de tres repeticiones

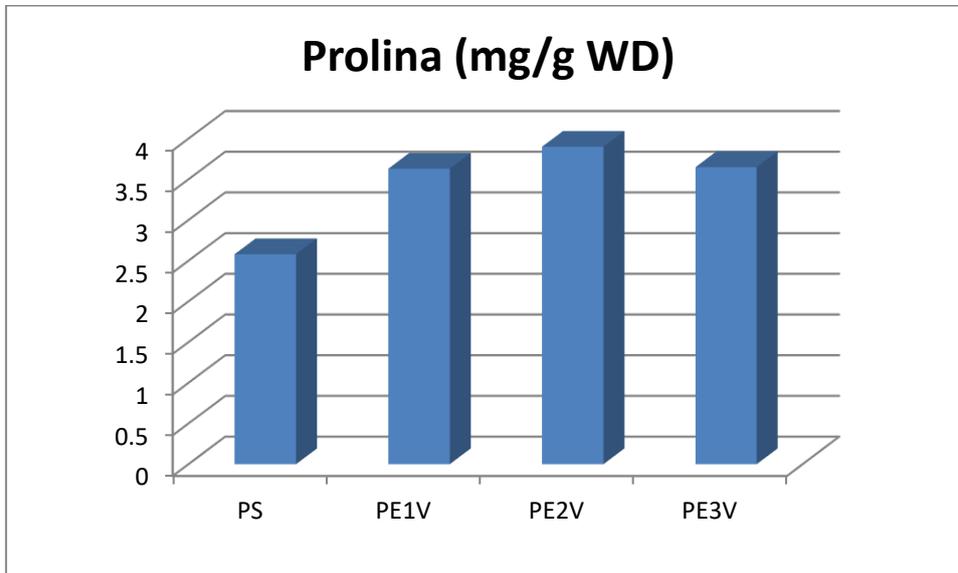


Figura 21: Contenido de prolina en muestras de planta sana y plantas enfermas

Tabla16: relación estadística entre muestras

	PS/PE1V	PS/PE2V	PS/PE3V	PE1V/PE2V	PE1V/PE3V	PE2V/PE3V
Nivel p	***	***	***	ns	ns	ns

Nota: *** - $p < 0,001$, ** - $p < 0,01$, * - $p < 0,05$, ns – no significativo.

Determinación de glicina-betaína

En las plantas enfermas con un virus, dos y tres el contenido de glicina-betaína estaba aumentado en un 72,50 %, 45,43 % y 57,68 % respectivamente, en comparación con la planta sana, utilizada como planta control negativo. El incremento promedio de las plantas enfermas fue 8,54 % con respecto a la planta sana.

Tabla17: contenido de glicina-betaína en planta sana y plantas enfermas

	PS	PE1V	PE2V	PE3V
Glicina-betaína (ug/g WD)	18,48 ± 1,52	31,88 ± 2,68	26,88 ± 3,02	29,14 ± 2,41
Incremento con respecto a PS	-	72,5 %	45,43 %	57,68 %

Nota: ± SD: Desv. estándar de tres repeticiones

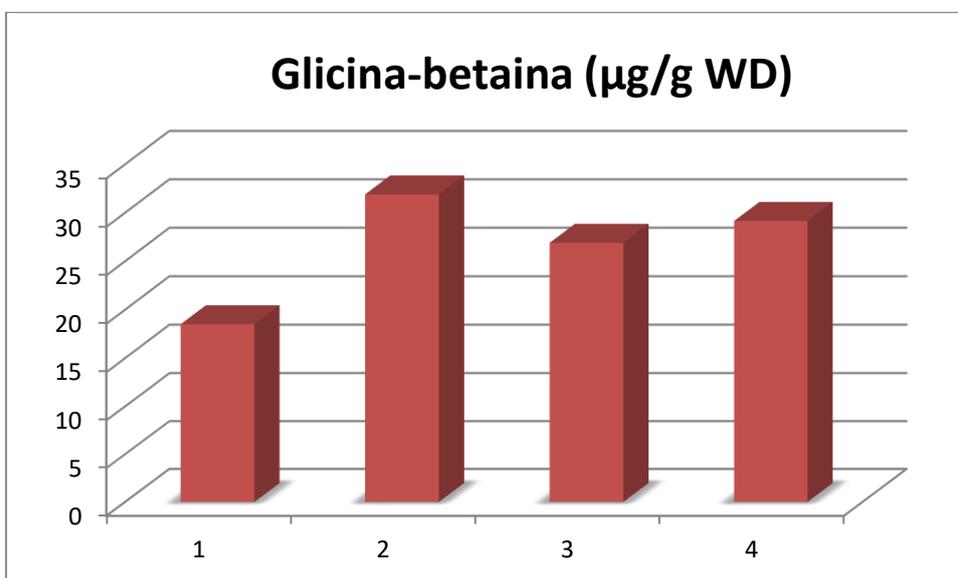


Figura 22: Contenido de glicina betaína en muestras de planta sana y plantas enfermas

Tabla 18: relación estadística entre muestras

	PS/PE1V	PS/PE2V	PS/PE3V	PE1V/PE2V	PE1V/PE3V	PE2V/PE3V
Nivel p	***	**	***	*	ns	ns

Nota: *** - p < 0,001, ** - p < 0,01, * - p < 0,05, ns – no significativo.

3.2-DISCUSSION

3.2.1-RESVERATROL COMO FITOALEXINA INDUCIDA EN RESPEUSTA AL ESTRÉS.

Los compuestos fenólicos están presentes tanto la planta de “vid” como en sus frutos, estas moléculas se caracterizan por poseer un anillo bencénico con uno o más grupos hidroxilos, ya sea en forma libre (aglicón) o unido a otros sustituyentes (glicósido).

Estos compuestos se clasifican en dos grupos, flavonoideos y no flavonoideos. Dentro de los flavonoides se encuentran clasificadas las antocianinas y flavonoles (Fig. 3), los cuales se pueden encontrar en su forma libre (aglicón) o glicosilados (glicósidos), éstos están presentes en semillas y hollejo.

Por otra parte, dentro de los compuestos no flavonoideos, se encuentran los ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzóicos y ácido cinámico) y estilbenos (Fig. 2). Mientas los ácidos fenólicos se encuentran mayormente en las bayas, los estilbenos se concentran mayoritariamente en las hojas y se sintetizan en respuesta a algún tipo de estrés, biótico (Infección por algún patógeno) o abiótico (estrés hídrico o salinidad) (Xi et al, 2015)

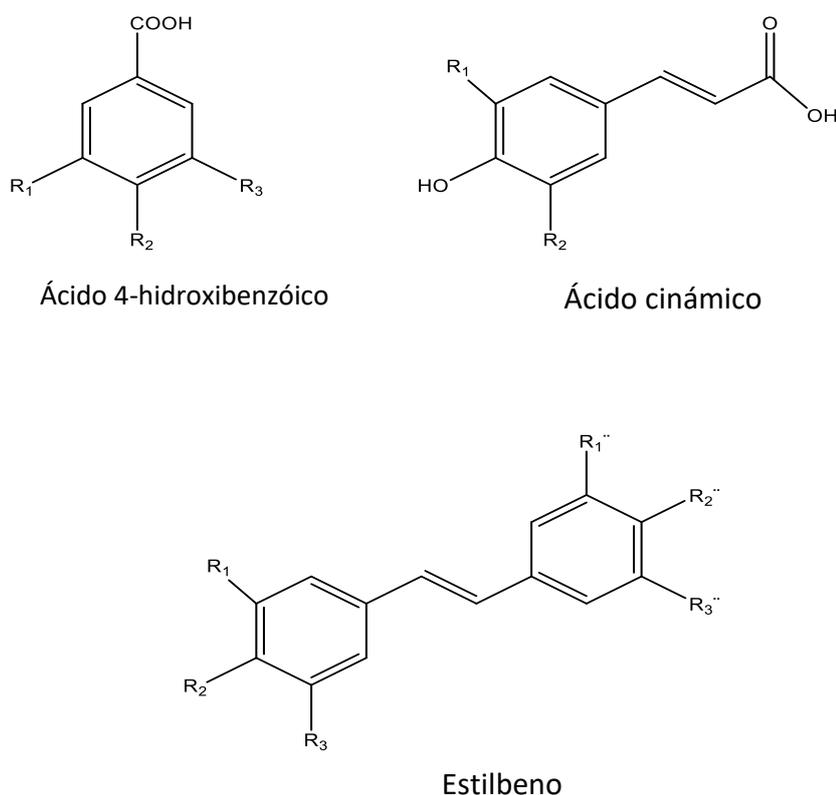


Figura 23: estructura molecular de ácidos fenólicos y estilbenos

Específicamente los estilbenos son fitoalexinas que aumentan desde el envero hasta la etapa de maduración de la uva. Como se indicó en el capítulo introductorio uno de los estilbenos más ampliamente estudiados es el 3,4,5"-trihidroxiestilbeno, comúnmente conocido como resveratrol (Fig. 2) (Pezet et al, 2004). El resveratrol se encuentra normalmente en concentraciones basales en las bayas, sintetizándose y aumentando su concentración per se, o de sus derivados, como piceido, piceatannol, viniferina o hidroxestilbeno (Fig. 1) en otras partes de la planta. Como, por ejemplo, en las hojas, cuando esta es atacada por patógenos como *Botritis cinérea*, *Plasmopara vitícola*, *Phomopsis vitícola* o *Rhizopus stonifer*, ya que estos compuestos poseen actividad antifúngica o inician la apoptosis celular, evitando así la propagación del agente patógeno (Timperio et al, 2012). Se ha demostrado una correlación entre la respuesta hipersensible y la acumulación de *trans*-resveratrol en especies de *Vitis* de tipo silvestres; como *V. rupestris*, que producen una mayor acumulación de la fitoalexina cuando son atacadas por patógenos. En cambio, una especie híbrida, como *V. vinífera cv Pinot Noir*, por ejemplo, produce esta fitoalexina en menor medida (Quiao et al, 2010). Si bien la respuesta es diferente, confirma que, en ambos casos, la molécula de resveratrol juega un papel importante en la respuesta hipersensible de la planta frente al ataque de patógenos. Se ha demostrado también que *in vitro*, la molécula de resveratrol presenta actividad antifúngica frente a zoosporas de *P. vitícola* y conidios de *B. cinerea*, evitando su germinación en concentraciones que van desde los 60 a 160 µg/ml.

La síntesis de resveratrol inicia a través de la vía metabólica fenilalanina/polimalonato, a partir de fenilalanina y/o tirosina (Fig. 3) que, con la ayuda de enzimas específicas, dan lugar al ácido p-hidroxicinámico. Este ácido por medio de la enzima Cumaril CoA ligasa, da lugar luego a las moléculas Malonil CoA y Cumaril CoA, esta última, por medio de la enzima resveratrol sintasa, da finalmente el producto resveratrol (Xi et al, 2015).

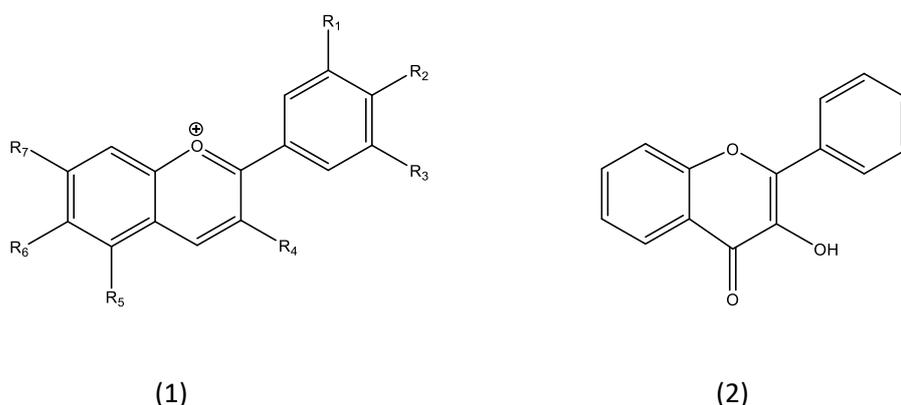


Figura 24: estructura molecular de una antocianina (1) y un flavonol (2)

La molécula de resveratrol se encuentra en las células en su forma *per se* o se sintetiza como intermediario con el fin de obtener alguno de sus derivados (Schnee et al, 2008). Esta molécula podría estar acumulándose en las hojas de las plantas enfermas, con el objetivo de contrarrestar el efecto del patógeno y/o también con el fin de sintetizar uno o más de sus derivados, los cuales podrían efectivamente ser el o los que generen este efecto sobre el agente patógeno (Timperio et al., 2012; Jeandet et al., 1995). El hecho que estén sucediendo ambas situaciones al mismo tiempo podría ser lo que explica un incremento tan abrupto en la acumulación de resveratrol en las hojas de las plantas infectadas. Esto se podría explicar tanto, como se dijo anteriormente, porque la planta sintetiza resveratrol con el objetivo de actuar sobre el patógeno, ya que la presencia de éste provoca un desequilibrio en los sistemas defensivos de la planta.

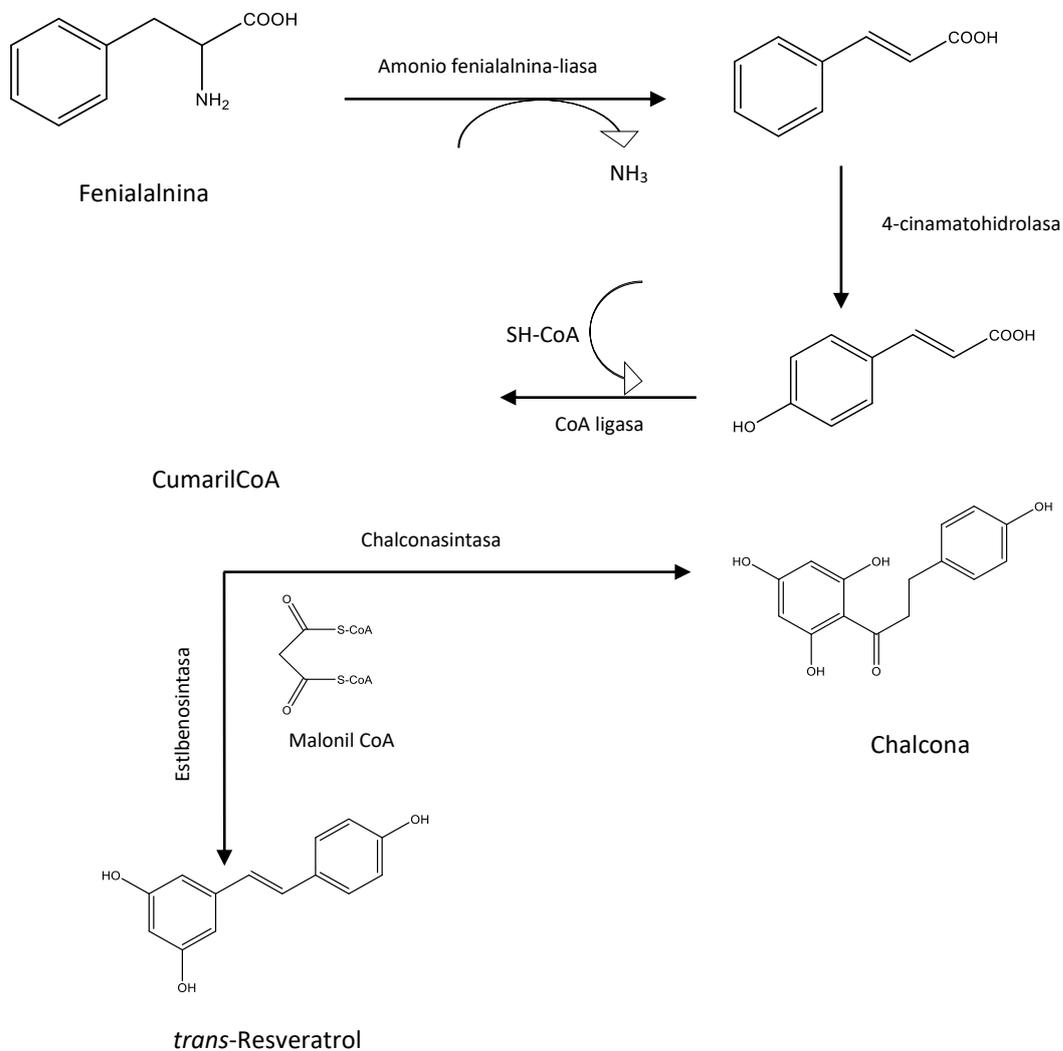


Figura 25: vía de síntesis de resveratrol (adaptado de Xi et al, 2015)

3.2.2 METABOLITOS PRINCIPALES INVOLUCRADOS EN LA INFECCION

El tocoferol juega un importante papel como antioxidante (Fan et al, 2010). El tocoferol se localiza en algunas membranas biológicas, especialmente en cloroplastos y tilacoides, allí tiene un rol activo en la regulación de los radicales lipídicos y las especies reactivas del oxígeno (ERO). De los cuatro isómeros presentes en la naturaleza (α , β , γ y δ), el α -tocoferol es quien mayor actividad antioxidante presenta, debido a los tres grupos metilo presentes en su estructura (Fig.5) En los cloroplastos el γ -tocoferol es convertido a α -tocoferol en una reacción catalizada por la enzima γ -tocoferol metiltransferasa (Fig. 6). El α -tocoferol tiene un indiscutible rol en la protección de las membranas celulares frente a las ERO (Falk y Munné-Bosch, 2010). Hasta ahora numerosas investigaciones han demostrado que la cantidad de α -tocoferol se incrementa durante el estrés (Heba, et al.). Este compuesto y sus isómeros reaccionan fácilmente con los radicales lipídicos libres y protege de las ERO formadas durante el estrés. Esta alta actividad antirradicalaria se relaciona al anillo aromático y los grupos hidroxilo presentes en su estructura, capaces de donar el hidrógeno del oxhidrilo fenólico a los radicales lipídicos, desactivándolos químicamente (Apel, K y Hirt, H.) Cuando las plantas son expuestas a un patógeno, la formación de las ERO se da principalmente en las hojas, provocando que en ellas se dé una acumulación de compuestos antioxidantes. El α -tocoferol contribuye a mantener la estructura de las membranas celulares, previniendo la oxidación de los ácidos grasos insaturados, provocada por estos compuestos (Foyer y Noctor, 2003). El incremento de α -tocoferol en tejidos de plantas infectadas con los virus objeto de estudio, sugiere que puede mejorar la resistencia a ellos, protegiendo a las membranas celulares del daño oxidativo producto del estrés, y también indica una mayor habilidad de adaptación por parte de las plantas a la infección viral. En la presente investigación se observó un aumento en la cantidad sintetizada de α -tocoferol en las plantas enfermas, en comparación con la planta sana, lo cual se condice con las investigaciones citadas anteriormente, e indicaría que éstas sintetizan dicho compuesto en respuesta a la infección viral.

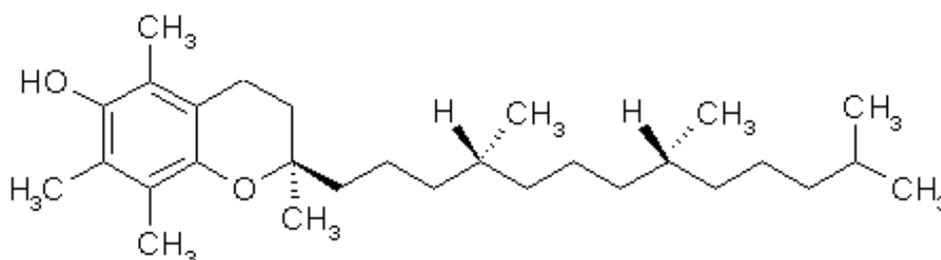


Figura 26: estructura de la molécula de α -tocoferol

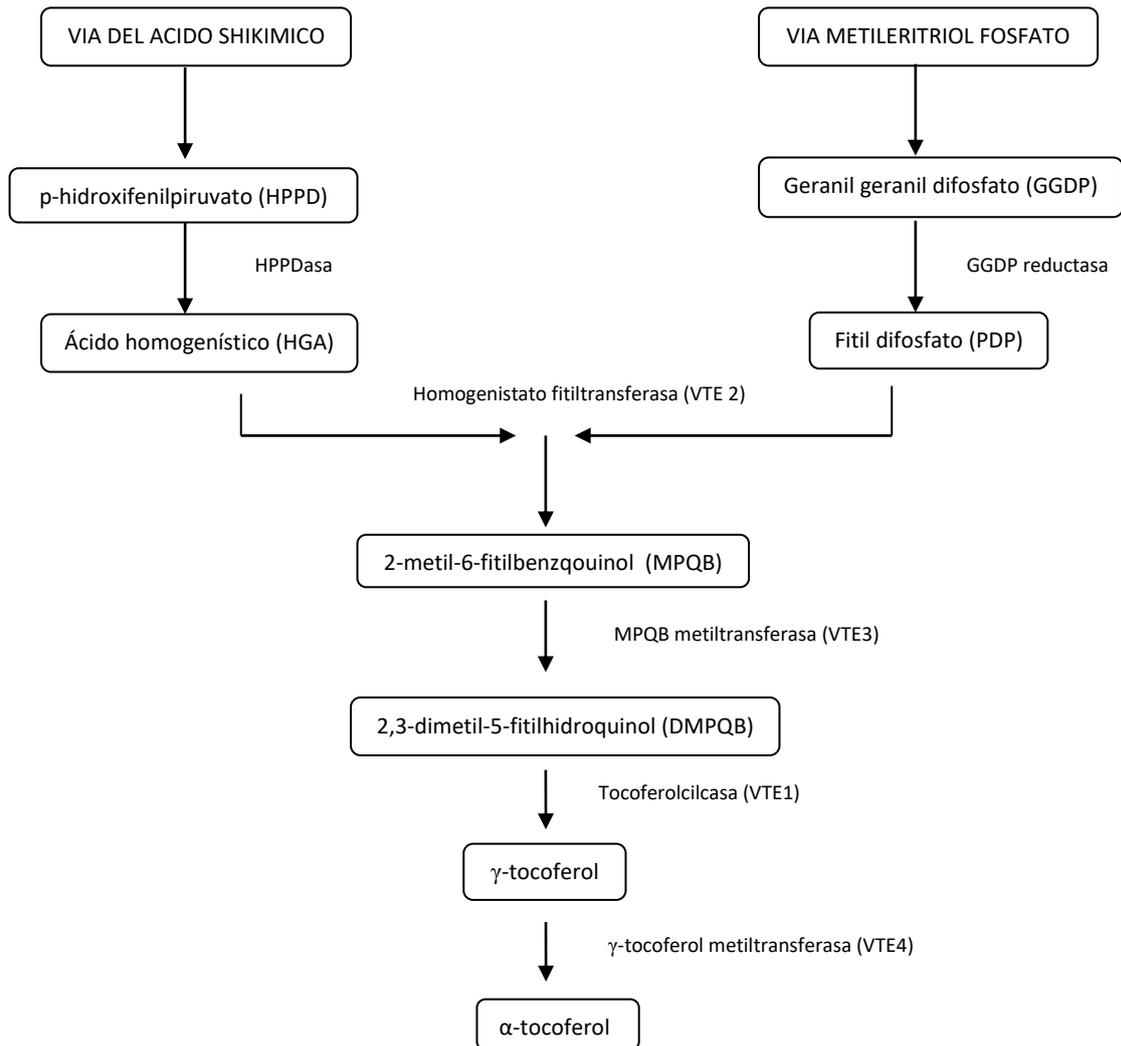


Figura 27: vías de síntesis de α -tocoferol en células vegetales

Los compuestos fenólicos, clasificados como compuestos antioxidantes, son metabolitos secundarios capaces de reaccionar contra las ERO, gracias a la capacidad de donar hidrógenos del/los oxhidrilo/s fenólicos (Jungmin y Robert, 2009). La producción de estos por parte de la célula se ve afectada por diferentes tipos de estrés: estrés biótico como el ataque de patógenos (Gould y Lister, 2006), o abiótico (estrés hídrico, salino, etc.), pudiéndose incrementar mientras dure el estrés (Agris, 2005). La tasa de acumulación de sustancias fenólicas antioxidantes dependerá de si la interacción planta-patógeno es compatible o incompatible, lo cual desarrollará o no la Respuesta Hipersensible, incrementando tanto la cantidad de estas sustancias como de las enzimas implicadas en sus rutas biosintéticas (Shalaby y Horwitz, 2015). Desde la perspectiva de la defensa de las plantas contra los virus, las actividades de desintoxicación de enzimas involucradas en la generación de ERO y los niveles de ERO deben estar estrechamente coordinados para mantener estas especies reactivas por debajo de los valores umbral que sean compatibles con el metabolismo de cada compartimento celular (Mullineaux y Karpinski, 2002).

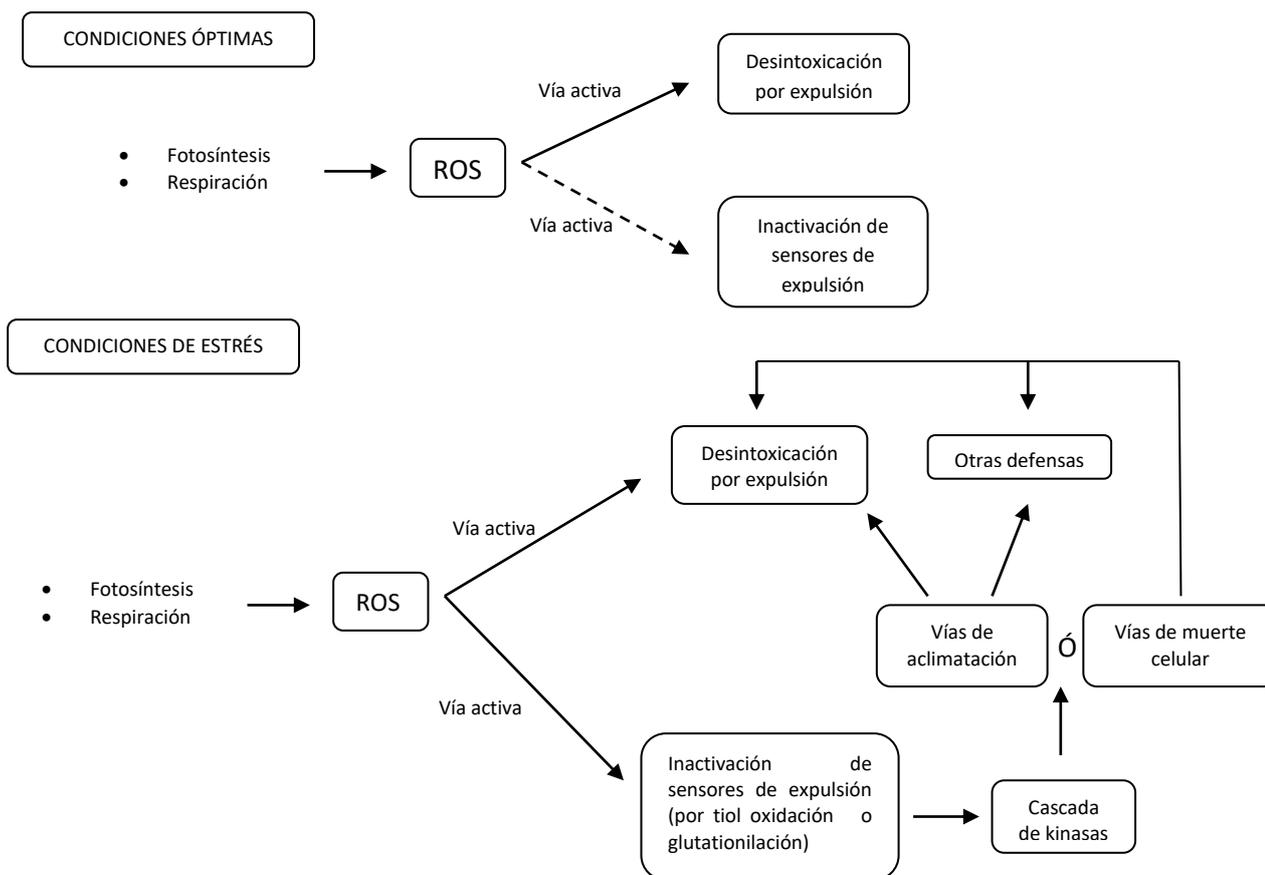


Figura 28: mecanismos de detoxificación de especies reactiva de oxígeno en tejidos.

En la Fig. 7 se muestran los mecanismos de detoxificación de ERO en tejidos. En óptimas condiciones, ERO son producidas por muchas reacciones metabólicas y son eliminados de manera eficiente por procesos de desintoxicación ("Recolección de desintoxicación"). En condiciones de estrés se produce un aumento de ERO, y como consecuencia un aumento en las enzimas detoxificantes y compuestos con habilidad de neutralizarlos, como mecanismo de "aclimatación" (regulación al alza de las ERO y capacidad de desintoxicación) o inducción de la muerte celular. Los factores decisivos que determinan, ya sea la aclimatación o muerte celular, no se conocen aún.

La asociación de formación de ERO y aumento de la actividad de las enzimas participando en su metabolismo con la inducción de la defensa, se ha demostrado para respuestas tanto compatibles como incompatibles en las interacciones planta-patógeno (Cristina et al, 2013). Otras investigaciones han informado sobre el incremento de compuestos fenólicos frente a interacciones fúngicas, bacterianas y virales patógenas de plantas, como por ejemplo en plantas de *Solanum lycopersicum* infectadas con *Ralstonia solanacearum* (Zu y Yao, 2008) y plantas de *Musa paradísica L.* infectadas con *Colletotrichum musae* (Ewané et al, 2012). Los resultados de la presente investigación son consistentes con lo reportado por Zaho et al (2008), donde se demuestra un aumento de la actividad antioxidante, y consecutivamente, un

aumento en la cantidad de compuestos fenólicos, en plantas infectadas con GLRaV-2, GLRaV-3 y GVA, lo que sugiere la habilidad de la planta para defenderse del patógeno, una vez que la interacción ha sido compatible.

Un aumento en el contenido de los azúcares solubles podría ser atribuido al efecto anti desnaturalizante frente a los complejos de lipoproteínas que se degradan durante el estrés biótico. Los resultados de este estudio son consistentes con otros que mostraron, por ejemplo, que la infección con *Sugarcane yellow leaf virus* (ScYLV) resultó en un incremento en la cantidad de carbohidratos solubles y almidón en hojas de las plantas de caña de azúcar (Lohaus et al, 200; Gonçalves et al, 2005; Lehrer et al, 2007). También se ha demostrado la acumulación de carbohidratos en plantas de papa (*Solanum tuberosum*) infectadas con *Potato leafroll virus* (Scagliusi, 2002). El aumento de azúcares solubles en hojas sintomáticas y asintomáticas de plantas con infección viral podría ser un producto del ensamblaje del virus en el floema (Fig. 8), y como consecuencia de una violación de la función *per se* del virus, alterando la relación origen/destino de los azúcares sintetizados, ya que estos no podrían ser transportados correctamente hacia los frutos (Lemoine et al, 2013). Como se mencionó, al comienzo del presente apartado, los resultados de la presente investigación son concordantes con las investigaciones previas, donde se observa, en las plantas infectadas con GLRaV y GVA, un mayor contenido de azúcares solubles, con respecto a la planta control, lo que explicaría el menor contenido de azúcares en las bayas de estas plantas.

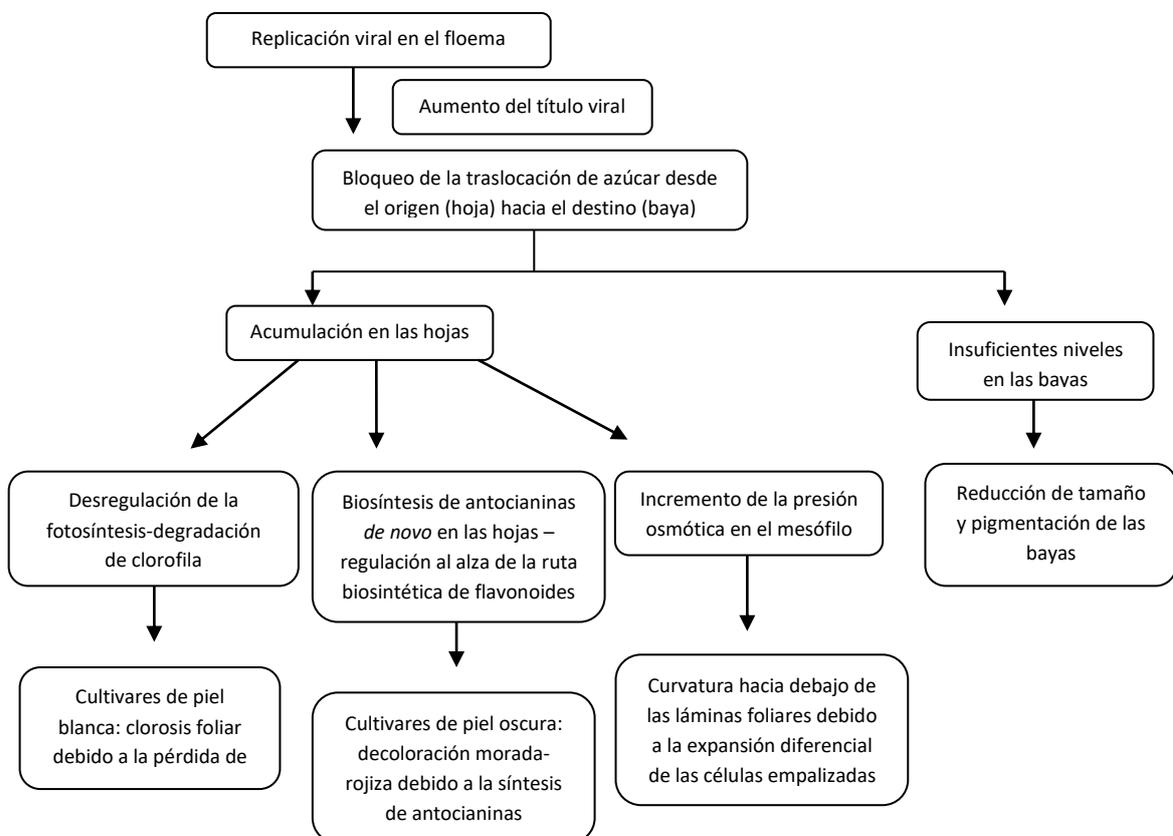


Figura 29: Descripción sistemática de la interacción entre GLRaV y su hospedero y los síntomas característicos de la enfermedad (adaptado de Song et al, 2021)

Algunas investigaciones han demostrado que plantas infectadas con GLV poseen altos niveles de estrés osmótico, y que ello ejerce una influencia sobre la cantidad de proteínas solubles que pueden sintetizar y acumular (Chavez et al, 2007; Cui et al, 2015). Por ejemplo, un estudio en plantas infectadas con GFLV y GLRaV-3 mostraron un incremento en el contenido total de proteínas solubles en plantas de vid infectadas con GLV (Sampol et al, 2003; Bertamini et al, 2004; Chavez, et al 2007). También se ha informado sobre el incremento en el contenido de proteínas solubles en plantas de banana infectadas con BBTV (Haq et al, 2012) y en plantas de papa infectadas con PLRV o PVY (Li et al, 2013). De acuerdo con Bertamini et al, una reducción pronunciada en la cantidad de proteínas solubles en plantas de “vid” infectadas con GLRV es atribuida a un decrecimiento en la síntesis de ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa. Un incremento en la cantidad de proteínas se asume a un incremento en el proceso general de síntesis de proteínas como una respuesta de las plantas al estrés oxidativo causado por la infección viral (Radwan et al, 2007), lo que explicaría porque las plantas infectadas con GLRaV y GVA poseen una mayor concentración de proteínas solubles en sus hojas, en comparación con la planta no infectada, según los resultados de esta investigación.

En la presente investigación, una elevada cantidad de prolina en plantas infectadas con GLRaV y GVA, fue observada en comparación con las plantas sanas (plantas control). Los resultados están en concordancia con los de algunas investigaciones previas (Fabro et al, 2004). Por ejemplo, se encontró que en plantas de papa infectadas con *Potato virus Y* y *Potato virus X* las concentraciones de prolina aumentaban luego de algunos días de llevada a cabo la infección (Bozarth y Diener, 1963). Esto también se observó en plantas de “soja” (*Glycine max*) bajo estrés salino (He et al, 2002), o también en plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) (Santosh y Mohanty, 1982). Los patógenos microbianos promueven la producción de ERO, los cuales pueden inducir la muerte celular programada en algunas células de hojas y tallos (Apel y Hirt, 2004; Adi et al, 2012). Actuando como un potente inhibidor de ERO, la molécula de prolina puede prevenir la apoptosis provocada por ellas, funcionando como un citoprotector y osmoprotector (Chen y Dickman, 2005). Así, la acumulación de este metabolito primario se explica como producto de la infección por GLRaV y GVA (Fabro et al, 2004).

En la presente investigación se observó que las plantas infectadas con GLRaV y GVA presentan un notorio aumento en la síntesis de glicina betaína, en comparación con la planta sana, lo cual es consistente con los resultados de investigaciones similares. La glicina betaína es un compuesto de amonio cuaternario, producto de la glicina, que juega un importante rol en la activación de la síntesis de los fosfolípidos de membrana (Ashraf y Foolad, 2007). La proteína holina y dos enzimas, holinamonooxigenasa y betainialdehido deshidrogenasa, juegan el principal rol en la síntesis de glicina betaína en plantas (Garcia et al, 1999). La glicina betaína puede acumularse en las hojas de plantas que se encuentran bajo diversas infecciones jugando un rol de osmolito y osmoprotector. Así, se involucra en la protección de la planta a través de la regulación del balance osmótico (Robinson y Jones, 1986; Ma et al, 2007), la estabilización de las enzimas antioxidantes y la estructura de las proteínas de membrana pertenecientes a los complejos de fotosíntesis oxigénica del fotosistema II (Rajasekaran et al, 1997). La molécula de glicina betaína regula la función del aparato fotosintético y, por lo tanto, protege a las células de la planta del daño causado por diferentes tipos de estrés, actuando como un protector de la enzima ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO) y el complejo generador de oxígeno del fotosistema II, en comparación con otros compuestos de nitrógeno

de bajo peso molecular (Allakhverdiev et al, 2003; Sakomoto y Murata, 2002). Bajo estos supuestos podemos deducir que la síntesis y acumulación de glicina betaina, al igual que la prolina, en las hojas de las plantas infectadas con GLRaV y GVA se da como consecuencia de la infección viral, que afecta especialmente al floema, no permitiendo el correcto transporte de los nutrientes hacia las células de las hojas, tendiendo estas moléculas a la protección de las membranas celulares del daño causado por el estrés generado por la infección por parte de estos patógenos virales.

CAPITULO IV

CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS A FUTURO

4.1 - CONCLUSION GENERAL

En la presente investigación se determinó que, bajo infección viral por *Leafroll virus* y *Grapevine Virus A*, las plantas de *V. vinifera* responden sintetizando resveratrol como fitoalexina inducida y aumentando la concentración de algunos metabolitos secundarios y primarios, como prolina, glicina betaína, proteínas y azúcares, que tienen alguna función protectora específica frente al estrés.

4.2 - PERSPECTIVAS A FUTURO

Cuando una enfermedad se convierte en endémica o un patógeno infecta periódicamente a especies no resistentes, como por ejemplo *Botrytis cinérea*, se considera de vital importancia conocer las bases que regulan el comportamiento fisiológico de la planta, ya que en base a este comportamiento se puede investigar la aplicación de esos mismos compuestos químicos que como elicitores, por ejemplo, evitando así que el proceso infectivo sea eficiente al momento de la invasión por parte del patógeno. Además de lo mencionado, también cabe destacar que estos compuestos, que podrían evaluarse como elicitores químicos, son compuestos sintetizados por la propia planta, no siendo tóxicos para el medio ambiente, especialmente no interfiriendo en el entorno biológico de los cultivos.

BIBLIOGRAFIA

Adi, M., Jens, P., Brotman, I., Mikhail, K., Iris, S. Henryk, K., Renal, G. Stress responses to *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) infection of resistant and susceptible tomato plants are different, *J Metabolomics*, (2012) 51: 1-13.

Almeida, R., Daane, K., Bell, V., Blaisdell, G., Cooper, M., Herrbach, E., Pietersen, G. Ecology and management of grapevine leafroll disease, *Frontiers in microbiology* (2013): 94.

Atallah, S., Gómez, M., Fuchs, M., Martinson, T. Economic Impact of Grapevine Leafroll Disease on *Vitis vinifera* cv. Cabernet franc in Finger Lakes Vineyards of New York. *AMERICAN JOURNAL OF ENOLOGY AND VITICULTURE*, (2012) 63: 79-79

Nguyen, P., Niemeyer, D. Effects of Nitrogen Fertilization on the Phenolic Composition and antioxidant properties of basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Agricultural Food Chem*, (2008) 56:8685–91.

Apel K, Hirt, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annu. Rev. Plant. Biol*, (2004) 55: 373-399.

Ashraf, M., Foolad, M. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance, *Environmental and Experimental Botany*, (2007) 59:206–216.

Bakhta, A., Amira, S., Hamadi, F., Monique, S., Mohamed, B. Anti-oxidant, anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of grapevine leaf extract (*Vitis vinifera*) in mice and identification of its active constituents by LC–MS/MS analyses. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, (2016) 84:1088-1098.

Bates, L. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and soil*, (1973) 39:205-207.

Bertamini, M., K. Muthuchelian, K., Nedunchezian, N. Effect of grapevine leafroll on the photosynthesis of field-grown grapevine plants (*Vitis vinifera* L. Cv. Lagrein), *J. Phytopathol.*, (2004) 152 : 145–152.

Bogdanove, A., Protein-protein interactions in pathogen recognition by plants, *Plant Molecular Biology*, (2002)50: 981–989.

Bozarth, F.H., Diener, R., Cahnges, T. Concentration in free aminoacids and amides induced in tobacco plants by *Potato virus X* and *Potato virus Y*. *Virology* (1963) 21:188-193.

Calderón, A., Zapata, J., Muñoz, R., Pedreno, M., Barcelo, S. Resveratrol production as a part of the hypersensitive-like response of grapevine cells to an elicitor from *Trichoderma viride* *New Phytology* (1993), 124: 455-463.

Calonnec, A.; Cartolaro, P.; Dubourdieu, D.; Darriet, P. Effects of Uncinulanecator on the yield and quality of grapes (*Vitis vinifera*) and wine. *Plant Pathol.* (2004) 53: 434-445.

Chaves, M., Santos, T., Souza, C., Ortuño, F., Rodrigues, M., Lopes, C. Deficit irrigation in grapevine improves water-use efficiency while controlling vigour and production quality, *Ann. Appl. Biol.* (2007) 150:237–252.

- Chen, C., Dickman, M. Proline suppresses apoptosis in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii*, *J. Plant Pathol*, (2005) 102: 3459–3464.
- Cristina, S., Annamaria, R., Mike, F. Antioxidative responses in *Vitis vinifera* infected by Grapevine fanleaf virus. *Journal of Plant Physiology*, (2013) 170: 121-128.
- Cui, Z.H., Bi, W.L., Chen, P., Xu, Y., Wang, Q.C. Abiotic stress improves in vitro biological indexing of Grapevine leafroll-associated virus-3 in red grapevine cultivars, *Aust. J. Grape Wine Res.*, (2015) 21:490–495.
- Deutscher, M. Guide to protein purification. Academic Press Inc. (1990) 182
- Dixon, R., Lahoucine A., Parvathi K., Chang-jun L., Srinivasa R., Liangjiang Wang, The phenylpropanoid pathway and plant defence - a genomics perspective, *Molecular plant pathology*,(2002) 3: 371–390.
- Ewané, P. Lepoivre, L. de Bellaire, L. Lassois, Involvement of phenolic compounds in the susceptibility of bananas to crown rot, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* (2012) 16: 393–404.
- Fabro, G., Kovacs, M., Pavet, I., Szabados, V., Alvarez, L. Proline accumulation and AtP5CS2 gene activation are induced by plant-pathogen incompatible interactions in *Arabidopsis*, *Mol. Plant Microbe Interact.* (2004) 17: 343–350,
- Falk, J., Munné-Bosch, S. Tocochromanol functions in plants: antioxidation and beyond. *The Journal of Experimental Biology*, (2010) 61: 1549-1566
- Fan, J., Chen, C., Brlansky, R.H., Gmitter, F.G, Lia, Z. Changes in carbohydrate metabolism in *Citrus sinensis* infected with '*Candidatus liberibacter asiaticus*', *Plant Pathol.*, (2010) 56:1037–1043.
- Foyer, G. Noctor, Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria, *Physiol. Plantarum*, (2003) 119: 355–364.
- G.N. Agrios, *Plant Pathology*, fifth ed., Elsevier Academic Press, San Diego, 2005, p. 105.
- Garcia, R., Jimenez, C., Mendoza, G, Hernandez, A. Munoz, C. Rapid Purification and Properties of Betaine Aldehyde Dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of bacteriology* (1999) 181: 1292–1300.
- Goncalves, J. Vega, G., Oliveira, M. Gomes, A. Sugarcane yellow leaf virus infection leads to alterations in photosynthetic efficiency and carbohydrate accumulation in sugarcane leaves, *Fitopatol. Bras.* (2005) 30:10–16.
- Gould, K. S., & Lister, C. (2006). Flavonoid function in plants. In O. M. Andersen & K. R. Markham (Eds.), *Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications* (pp. 397–441). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Grieve, C., Grattan, S. Rapid assay for the determination of water-soluble quaternary ammonium compounds. *Plant Soil*, (1983) 70: 303–307.
- Guerrero, R., Valls-Fonayet, J., Richard, T. Cantos-Villar., E. A rapid quantification of stilbene content in wine by ultraa-high pressure liquid chromatography – Mass spectrometry. *Food Control*, (2020) 108: 1-9.

Hans, K. and Behavior, J. The determination of tocopherols with iron-bipyridine reagent in the presence of fats, The department of pathology, College of Physicians and Surgeons, and of Chemistry, Columbia University, (1944) 653-659.

Haq, I., Nazia, P., Muhammad, T., Muhammad, U. Comparative characteristics of micropropagated plantlets of banana from BBTv-infected explants to its normal and saline stressed cultures, Pakistan J. Bot. (2012) 44: 1127–1130.

Harborne, J. (1998). *Phytochemical Methods, A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*, Chapman & Hall, London, UK, 8.

He, C., Zhang, Z., Chen, Y. A soybean gene encoding a proline-rich protein is regulated by salicylic acid, an endogenous circadian rhythm and by various stresses, Theor Appl Genet., (2002) 104: 1125–1131

Heba, M., Aly A., Mahmoud, M., Abd, E. Association of oxidative stress components with resistance to flax powdery mildew. *Tropical Plant Pathology*, (2012) 37:386-392.

Hutchenson, S. Current concepts of active defense in plants, Annual Review Phytopathology, (1998) 36: 59–90.

Jeandet, P., Bessis, R., Sbagi, M., Meunier, P., Production of the Phytoalexin Resveratrol by Grapes as a Response to *Botrytis* Attack Under Natural Conditions, J. Phytopathology (1995) 143: 135-139.

Jeandet, P., Phytoalexins: Current Progress and Future Prospects, Molecules (2015) 20: 2770-2774.

Jinkang, S., Hao, J., Ping, W., Tao, W., Zhiming, L. Exogenous gibberellin weakens lipid breakdown by increasing soluble sugars levels in early germination of zanthoxylum seeds. Plant Science, (2019) 280:155-163.

Jungmin, L., Robert, R. Influence of grapevine leafroll associated viruses (GLRaV-2 and -3) on the fruit composition of Oregon *Vitis vinifera* L. cv. Pinot noir: Phenolics. Food Chemistry, (2009) 112: 889–896.

Krüger, K., Saccaggi, D., Van der Merwe, M., Kasdorf, G. Transmission of *Grapevine Leafroll-associated Virus 3* (GLRaV-3): Acquisition, Inoculation and Retention by the Mealybugs *Planococcus ficus* and *Pseudococcus longispinus* (Hemiptera: Pseudococcidae). S. Afr. J. Enol. Vitic., (2015) 36: 223-230.

Kuc, C. Phytoalexins, stress metabolism, and disease resistance in plants, Annual Review Phytopathology (1995) 33: 27-97.

Komorowska, B., Berniak, H., Golis, T. Detection of Grapevine Viruses in Poland. Journal of Phytopathology. (2014) 162: 326-331.

Lehrer, P., Moore, E. Komor, A. Impact of *Sugarcane yellow leaf virus* (ScYLV) on the carbohydrate status of sugarcane: comparison of virus-free plants with symptomatic and asymptomatic virus-infected plants, Physiol. Mol. Plant Pathol., (2007) 70: 180–188

Lemoine, R. LaCamera, S., Atanassova, S., Dédaldéchamp, F., Allario, T., PourtaU N, Bonnemain, J., Laloi, M., Coutos-Thévenot, P., Maurousset, L., Faucher, M., Gironse, M.,

- Lemonnier, M., Parrilla, J., Durand, M. Source to sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Frontiers in plant science*, (2013) 4: 1-21
- Li, B., Wang, M., Song, R., Wang, H., Zhang, B. Potato leafroll virus (PLRV) and Potato Virus Y (PVY) influence vegetative, physiological metabolism of in vitro-cultured shoots of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Cell Tiss.* (2013) 114:313–324.
- Li, R. Chuan-sia, T., Yu-Lin Jiang, Xi-Yuan Jiang, Prasanna Nori Venkatesh, Rajani Sarojam, Jian Ye, A terpenoid phytoalexin plays a role in basal defense of *Nicotiana benthamiana* against Potato virus X. *Scientific Report*, (2015) 9652:1-6
- Lohaus, G., Hussmann, M., K. Pennewiss, H. Solute balance of a maize (*Zea mays* L.) source leaf as affected by salt treatment with special emphasis on phloem retranslocation and ion leaching, *J. Exp. Bot.*, (2000) 51: 1721–1732.
- Ma, X.L., Wang, Y.J, Xie, S.L., Wang, C., Wang, W. Glycine betaine application ameliorates negative effects of drought stress in tobacco. *Russian Journal of Plant Physiology*, (2007) 54: 534-541.
- Mannini F, Mollo A, Credi R. Field performance and wine quality modification in a clone of *Vitis vinifera* cv. Dolcetto after GLRaV-3 elimination. *Am J Enol Vitic*, (2012) 63:144–147.
- Maree, H., Almeida, P., Bester, R., Chooi, K., Cohen, D., Dolja, V., Fuchs, M., Golino, D., Jooste, A., Martelli, G., Naidu, R., Rowhani, A., Saldarelli, P., Burger, J. *Grapevine leafroll-associated virus 3*. *frontiers in Microbiology*, (2013) 82.
- Martelli, G.P. 2009. Grapevine virology highlight 2006-2009. *In* Extended Abstracts. 16th Meeting of the International Council for the Study of Virus and Virus-Like Disease of the Grapevine, Dijon, France, pp. 15-23 (www.icvg.ch/archive.htm).
- Martelli, G.P. Directory of virus and virus-like diseases of the grapevine and their agents. *Journal of Plant Pathology*, (2014) 96: 1-4.
- Martin, A., Cuadrado, Y., Guerra, H., Gallego, P., Hita, O., Martin, L., Dorado, A., Villalobos, N. Differences in the contents of total sugars, reducing sugars, starch and sucrose in embryogenic and non-embryogenic calli from *Medicago arborea* L. *Plant Science*, (2000) 154:143-151.
- Martinek, R. Method for the determination of Vitamin E (Total Tocopherols) in Serum. 1968.
- Martinez, L., Miranda, C., Royo, J., Urrestarazu, J., Martinez de Toda, F., Balda, P. Santesteban, L. Direct and indirect effects of three virus infections on yield and berry composition in grapevine (*Vitis vinifera* L.) cv “Tempranillo”, *Scientia Horticulturae*, (2016) 212: 20-28
- Mohamed, H., Abdullah, M., Plant hypersensitive response vs pathogen ingressión: Death of few gives life to others, *Microbial pathogenesis*, (2020) 145: 2-8.
- Moutinho-Pereira, J., Correia, C., Gonclve, B., Bacelar, E., Coutinho, J., Ferreira H., Impacts of leafroll-associated viruses (GLRaV-1 and -3) on the physiology of the Portuguese grapevine cultivar ‘Touriga Nacional’ growing under field conditions, *Ann. Appl. Biol.*, (2012) 160: 237–249.

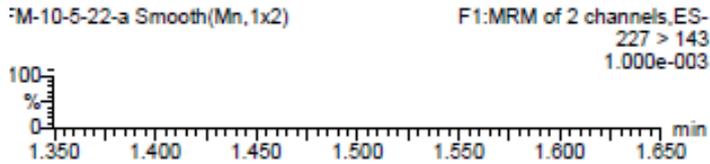
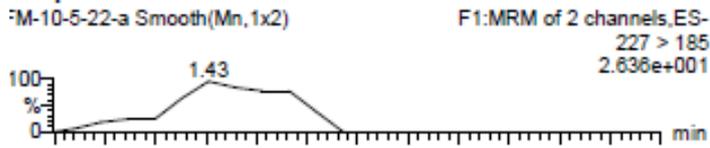
- Mullineaux P, Karpinski S. Signal transduction in response to excess light: getting out of the chloroplast. *Curr Opin Plant Biol.*, (2002) 5:8-43
- Nelson, S., Citovsky, V. Plant viruses. Invaders of cells and pirates of cellular pathways, *Plant Physiology*, (2005) 138: 1809-1814.
- Nguyen M., Niemeyer, D. Effects of nitrogen fertilization on the phenolic composition
Noman, A., Muhammad, A., Sameer, H., Ameen, A., Surhaneed, A., Yasin, G., Alamrif, S.
Oliveira, F., Cassi, R., Caraballo, A., Tallarico, M., Chemical signaling involved in plant-microbe interactions, *Chemical Society Review* (2018) 47: 1652-1704.
- Osbourn, A. Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack, *The Plant Cell*, (1996) 8: 1821-1831.
- Pezet, R., Gindro, R., Viret, O. Spring, L. Glycosylation and oxidative dimerization of resveratrol are respectively associated to sensitivity and resistance of grapevine cultivars to downy mildew, *Physiological and Molecular Plant Pathology.*, (2004) 65:297-303.
- Prior, L., Wu, X., Schaich, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (2005) 53: 4290-4302.
- Qiao, F., Chang, X.L., Nick, P. The cytoskeleton enhances gene expression in the response to the Harpin elicitor in grapevine. *J Exp Bot*, (2010) 61: 4021–4031.
- Radwan, K., Fayed, S., Mahmoud, A. Hamad, Y., Lu, G. Physiological and metabolic changes of Cucurbita pepo leave in response to zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) infection and salicylic acid treatments, *Plant Physiol. Biochem.*, (2007) 45: 480–489.
- Rajasekaran, I., Kriedemann, P., Aspinall, D., Paleg, I. Physiological significance of proline and glycinebetaine: maintaining photosynthesis during NaCl stress in wheat, *Photosynthetica*, (1997) 34:357–366.
- Ramalingam, P., Tag Ko, Y., Validated LC–MS/MS method for simultaneous quantification of resveratrol levels in mouse plasma and brain and its application to pharmacokinetic and brain distribution studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (2016) 119: 71–75.
- Robinson, S.P. Jones, G.P. Accumulation of glycine betaine in chloroplast provides osmotic adjustments during salt stress, *Aust. J. Plant Physiol.* (1986) 13:659–668.
- Rosenberg, H. *Chemistry and Physiology of the Vitamins*. Interscience Publishers, New York, 1992, pp. 452–453.
- Sakamoto, A., Murata, N. The role of glycinebetaine in the protection of plants from stress: clues from transgenic plants, *Plant Cell Environ.*, (2002) 25:163–171.
- Sampol, B., Bota, J., Riera, D., Medrano, H., Flexas, J. Analysis of the virus-induced inhibition of photosynthesis in malmsey grapevines, *New Phytol.*, (2003) 160:403–412.
- Santosh, K., Mohanty. Physiology of rice tungro virus disease: Proline accumulation due to infection. *Physiologia Plantarum*, (1982) 56: 89-93
- Scagliusi, S., Vega, J., Kuniyuki, H. Cytopathology of callus cells infected with grapevine leafroll-associated virus 3, *Fitopatol. Bras.* (2002) 27:384–388.

- Schnee, S. Viret, O., Gindro, K. Role of stilbenes in the resistance of grapevine to powdery mildew. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, (2008) 72:128–133.
- Shalaby, S., Horwitz, B. Plant phenolic compounds and oxidative stress: integrated signals in fungal-plant interactions, *Curr. Genet.*, (2015) 61:347–357.
- Song, Y., Robert, H., Meng, B. Probing into the Effects of Grapevine Leafroll-Associated Viruses on the Physiology, Fruit Quality and Gene Expression of Grapes. *Viruses*, (2021) 13: 2-23.
- Stange, C. Interacción planta-virus durante el proceso infeccioso, *Ciencia e Investigación Agraria*, (2006) 1: 21-33.
- Timperio, A., D'Alessandro, A., Fagioni, M., Magro, P., Zolla, L Production of the phytoalexins trans-resveratrol and delta-viniferin in two economy-relevant grape cultivars upon infection with *Botrytis cinerea* in field conditions. *Plant Physiology and Biochemistry*, 50 (2012): 6571.
- Xi, H-F., Ma, L., Wang, L-N., Li, S-H., Wang, L-J, Differential response of the biosynthesis of resveratrol and flavonoids to UV-C irradiation in grape leaves, *New Zealand of Crop and Horticultural Science.*, (2015) 43:163-172.
- Zhao, H., Fan, W., Dong, J., Lu, J., Chen, L., Shan, Y., Lin, W. Evaluation of antioxidant activities and total phenolic contents of typical malting barley varieties, *Food Chem.*, (2008) 107: 296–304.
- Zhen, Q., Xinnian D., Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense, *Annual review of plant biology*, (2013) 64: 839-863.
- Zhu, Q. Yao, I. Localized and systemic increase of phenols in tomato roots induced by *Glomus versiforme* inhibits *Ralstonia solanacearum*, *J. Phytopathol.*, (2004) 152: 537–542.

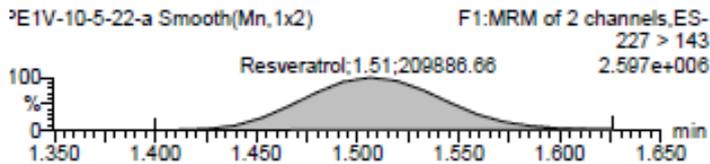
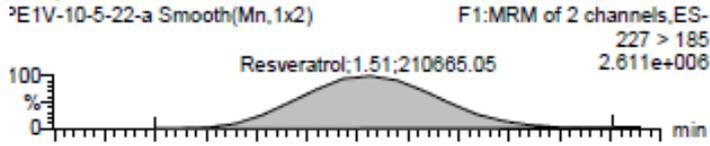
ANEXO I

Cromatogramas de extractos de *trans*-resveratrol y curva de calibración con *trans*-resveratrol estándar a diferentes concentraciones

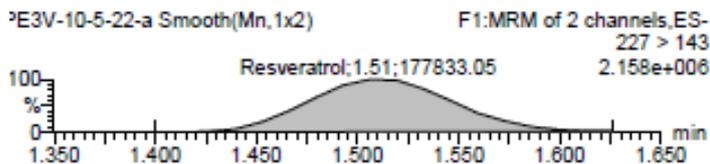
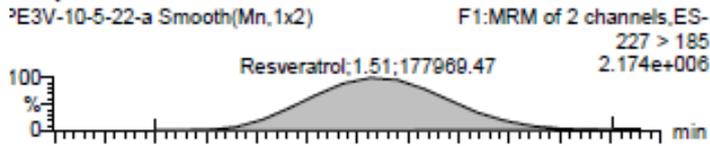
Sample Name: FM-10-5-22-a



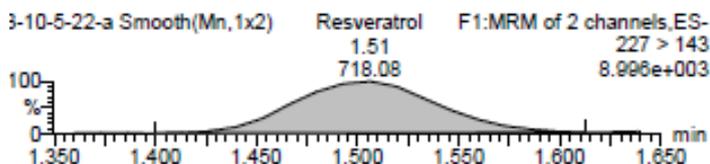
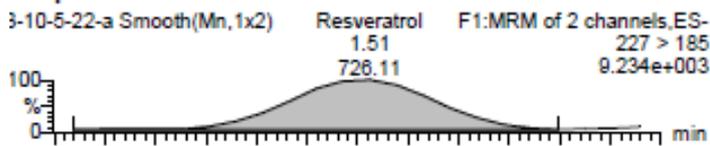
Sample Name: PE1V-10-5-22-a



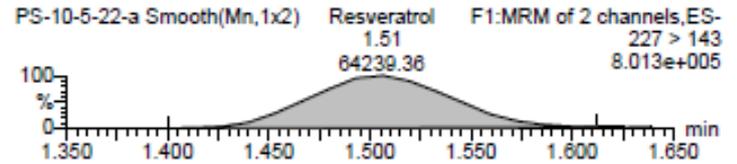
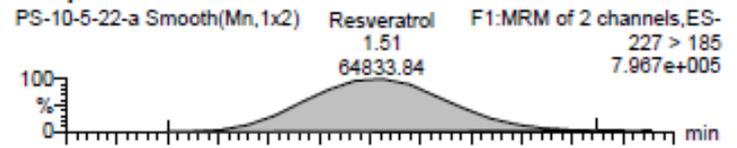
Sample Name: PE3V-10-5-22-a



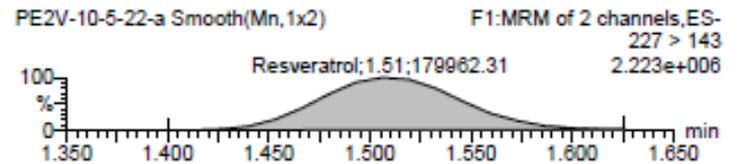
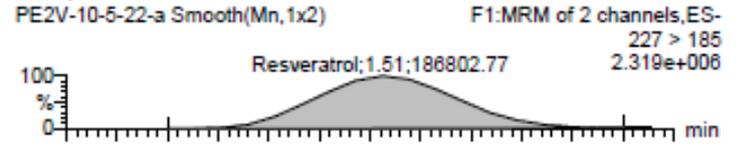
Sample Name: B-10-5-22-a



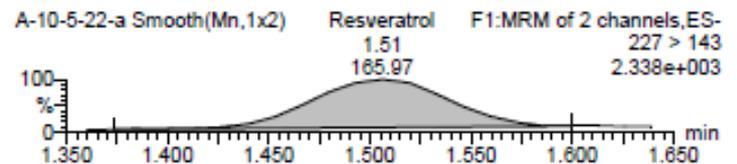
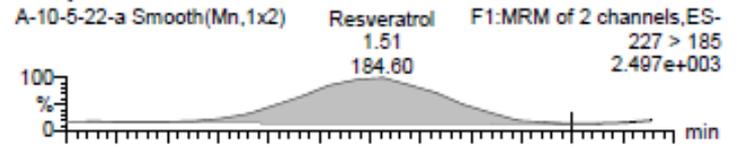
Sample Name: PS-10-5-22-a



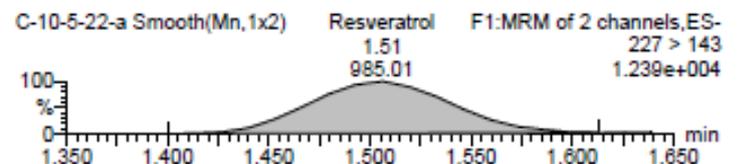
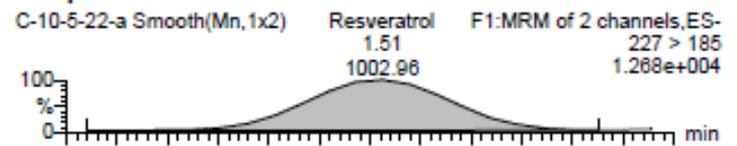
Sample Name: PE2V-10-5-22-a



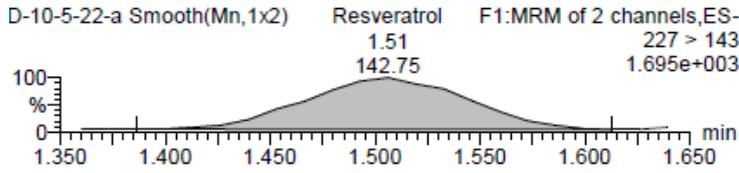
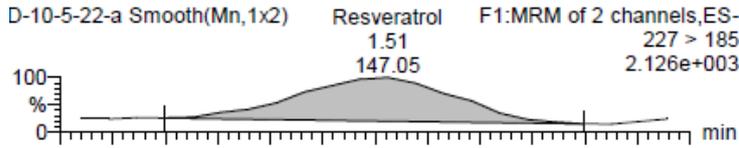
Sample Name: A-10-5-22-a



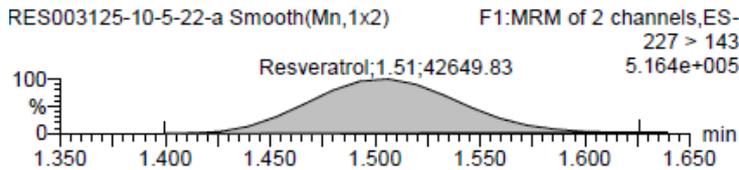
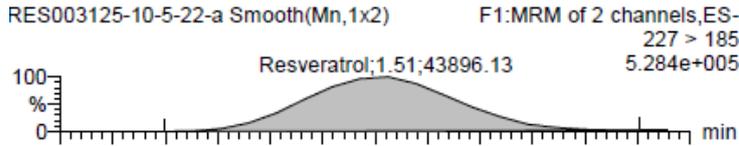
Sample Name: C-10-5-22-a



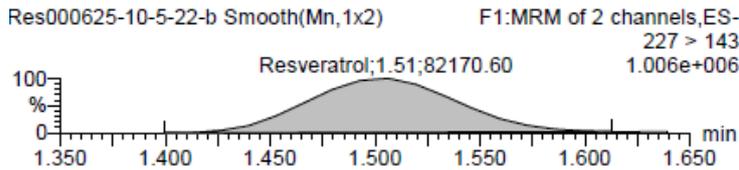
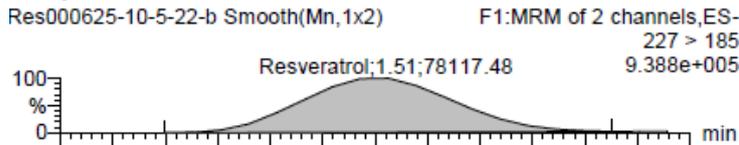
Sample Name: D-10-5-22-a



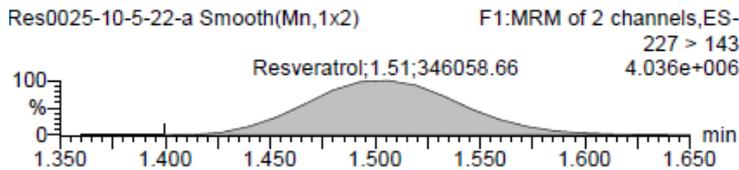
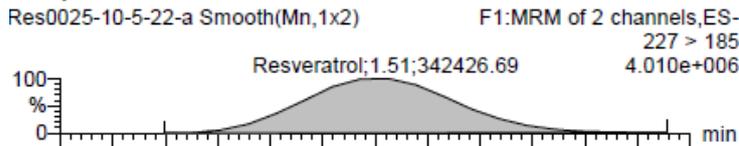
Sample Name: RES003125-10-5-22-a



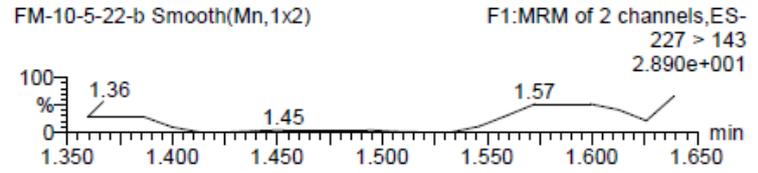
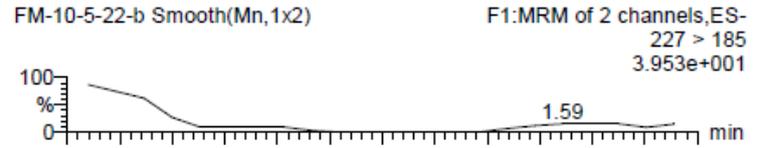
Sample Name: Res000625-10-5-22-b



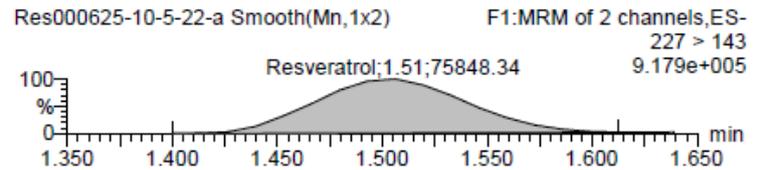
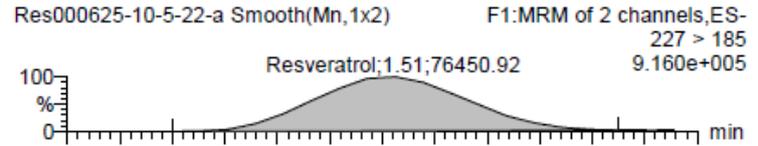
Sample Name: Res0025-10-5-22-a



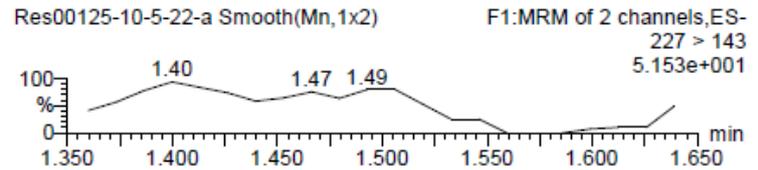
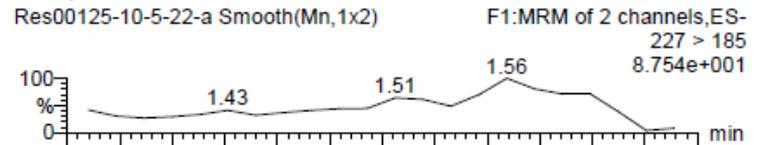
Sample Name: FM-10-5-22-b



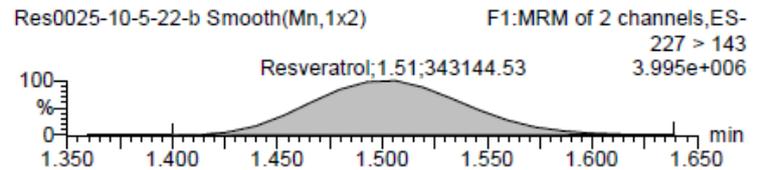
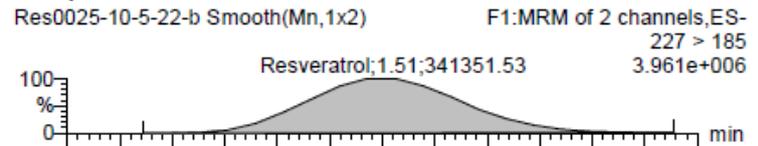
Sample Name: Res000625-10-5-22-a

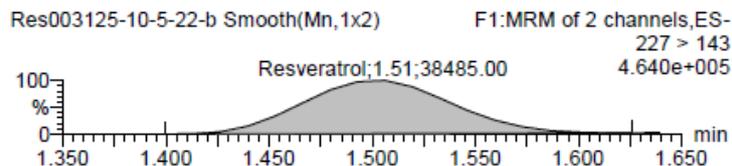
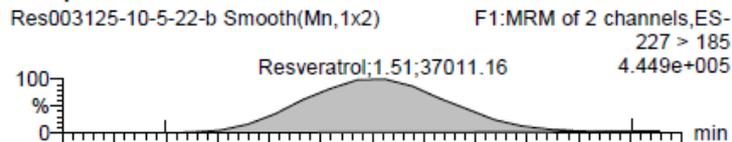
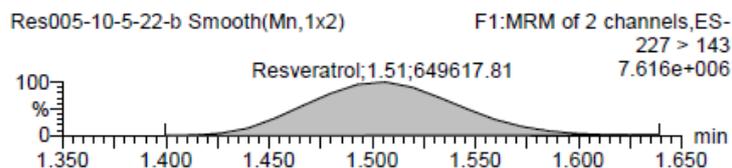
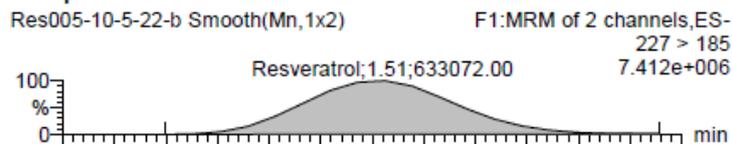
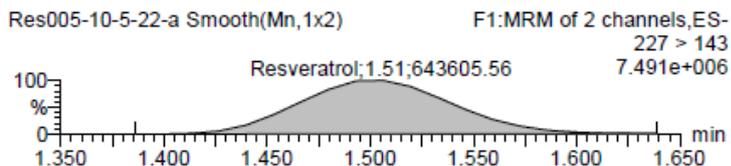
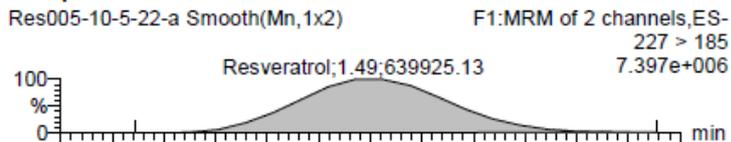
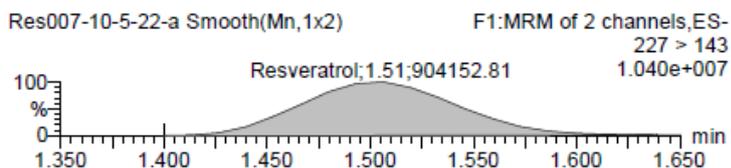
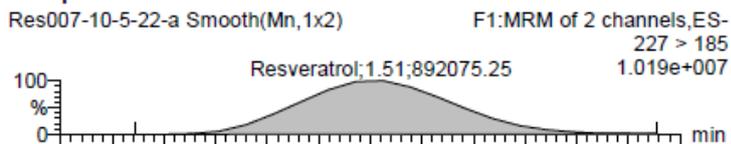


Sample Name: Res00125-10-5-22-a



Sample Name: Res0025-10-5-22-b

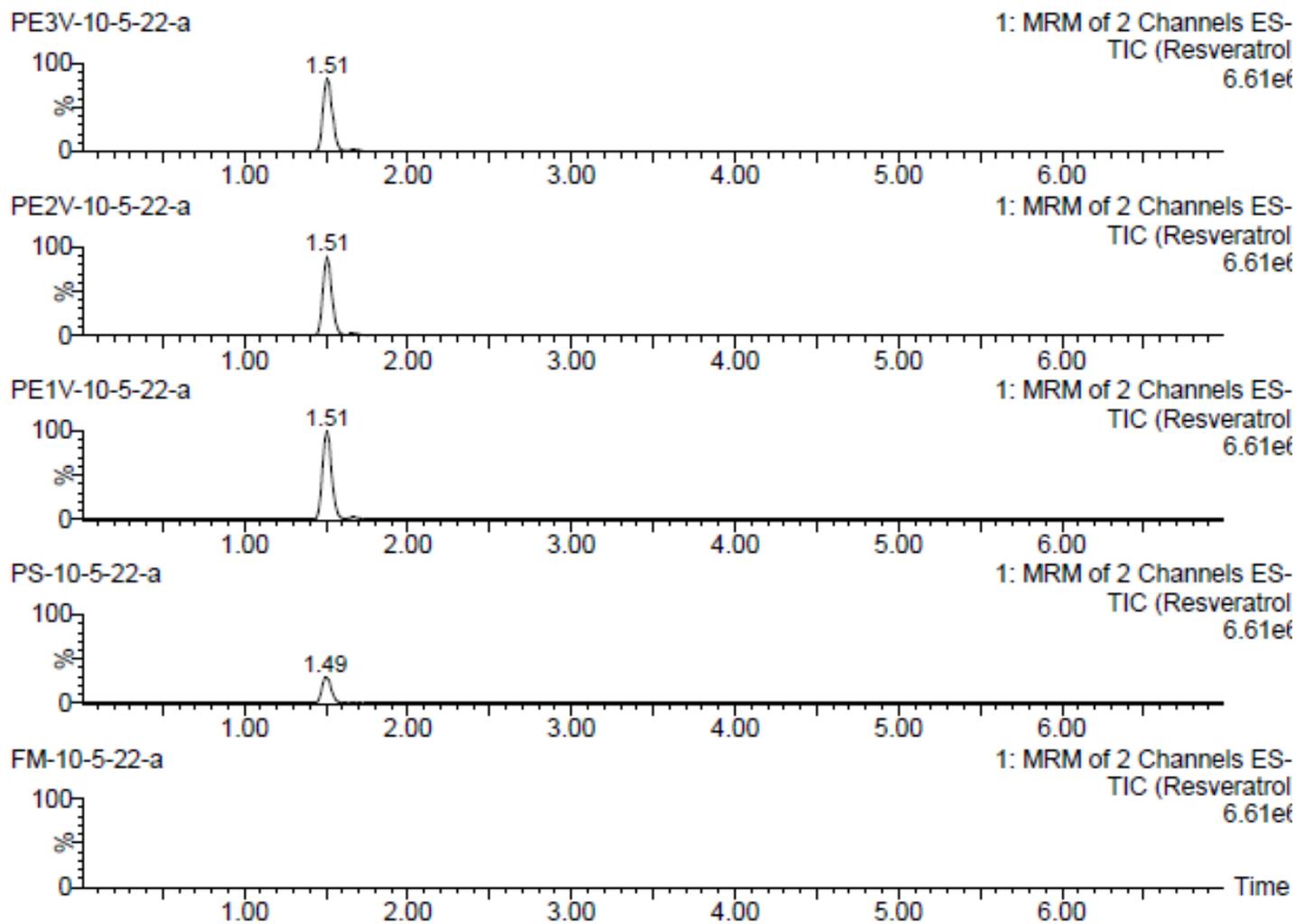


Sample Name: Res003125-10-5-22-b**Sample Name: Res005-10-5-22-b****Sample Name: Res005-10-5-22-a****Sample Name: Res007-10-5-22-a**

	Name	Sample Text	Acq.Date	Acq.Time	RT	Height	Area	Primary...
1	FM-10-5-22-a		10-May-22	13:35:38				
2	PS-10-5-22-a		10-May-22	13:43:30	1.51	786625	64834	bb
3	PE1V-10-5-22-a		10-May-22	13:51:38	1.51	2591104	210665	bb
4	PE2V-10-5-22-a		10-May-22	13:59:29	1.51	2301329	186803	bb
5	PE3V-10-5-22-a		10-May-22	14:07:18	1.51	2155844	177969	bb
6	A-10-5-22-a		10-May-22	14:15:11	1.51	2158	185	bb
7	B-10-5-22-a		10-May-22	14:23:03	1.51	8685	726	bb
8	C-10-5-22-a		10-May-22	14:30:52	1.51	12111	1003	bb
9	D-10-5-22-a		10-May-22	14:38:40	1.51	1699	147	bb
10	FM-10-5-22-b		10-May-22	14:46:29				
11	RES003125-10-5-22-a		10-May-22	14:54:18	1.51	522808	43896	bb
12	Res000625-10-5-22-a		10-May-22	15:33:10	1.51	904560	76451	bb
13	Res000625-10-5-22-b		10-May-22	15:37:06	1.51	926825	78117	bb
14	Res00125-10-5-22-a		10-May-22	15:40:58				
15	Res0025-10-5-22-a		10-May-22	15:44:45	1.51	3986841	342427	bb
16	Res0025-10-5-22-b		10-May-22	15:48:32	1.51	3938662	341352	bb
17	Res003125-10-5-22-b		10-May-22	15:52:22	1.51	440107	37011	bb
18	Res005-10-5-22-a		10-May-22	15:56:13	1.49	7354039	639925	bb
19	Res005-10-5-22-b		10-May-22	16:00:01	1.51	7365183	633072	bb
20	Res007-10-5-22-a		10-May-22	16:03:47	1.51	10123155	892075	bb
21	Res01-10-5-22-a		10-May-22	16:07:38	1.51	12841221	1154193	bb
22	Res01-10-5-22-b		10-May-22	16:11:29	1.51	12529231	1136210	bb
23	Res015-10-5-22-a		10-May-22	16:15:16	1.49	17050176	1609250	bb
24	Res02-10-5-22-a		10-May-22	16:19:03	1.49	20997192	1979436	bb
25	Res02-10-5-22-b		10-May-22	16:22:57	1.49	20625836	1961127	bb

ANEXO II

Cromatogramas TIC y MRM
de extractos buscando
resveratrol y sus derivados

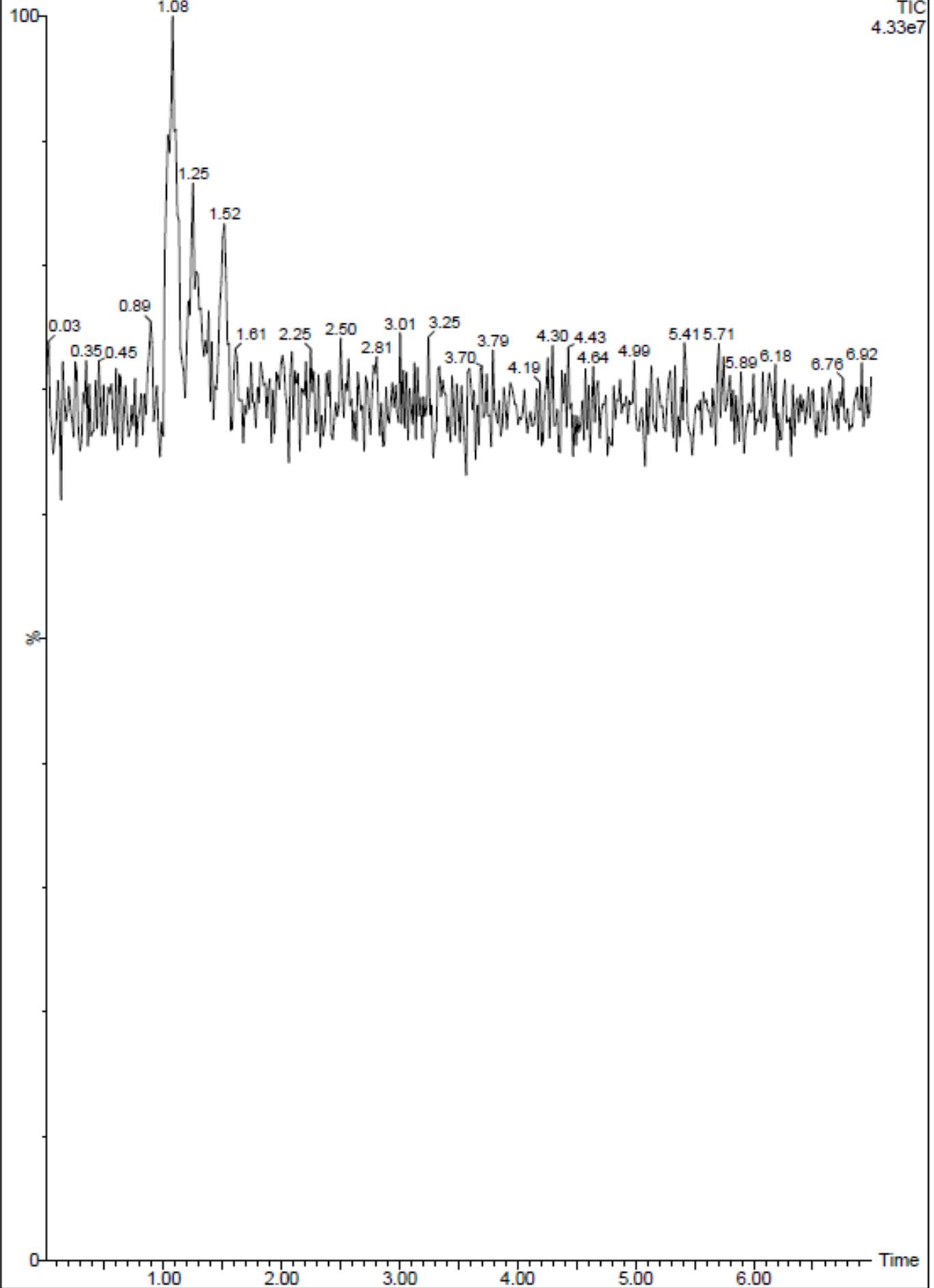


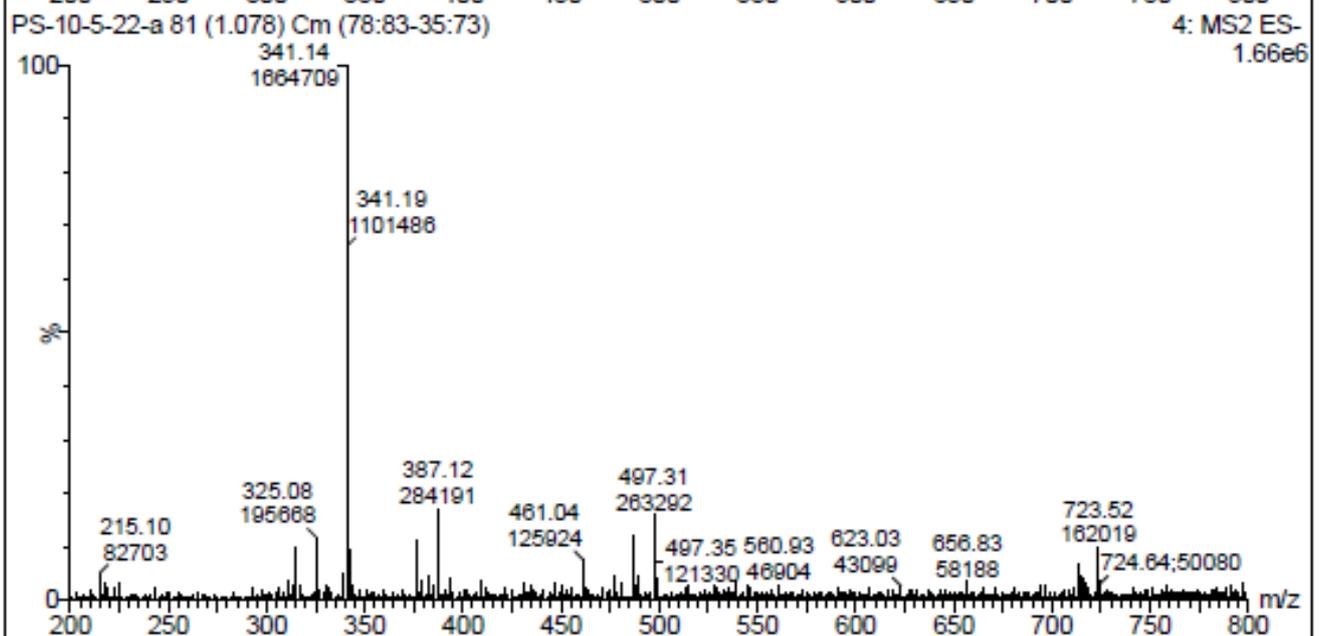
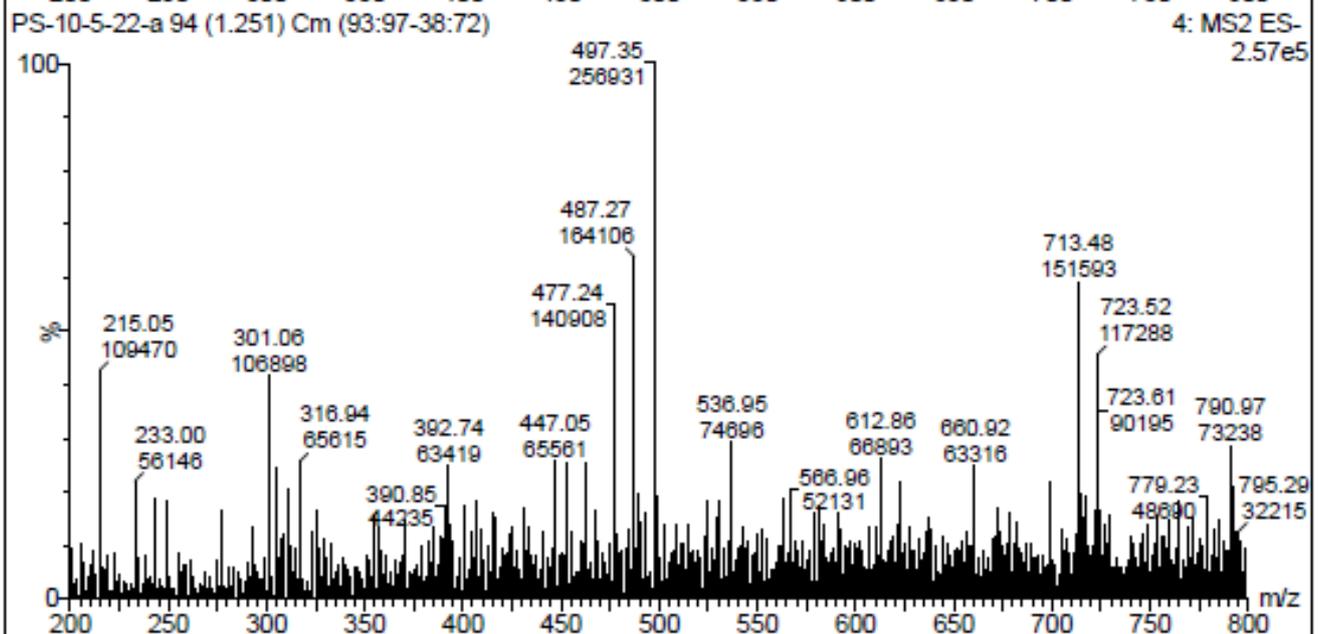
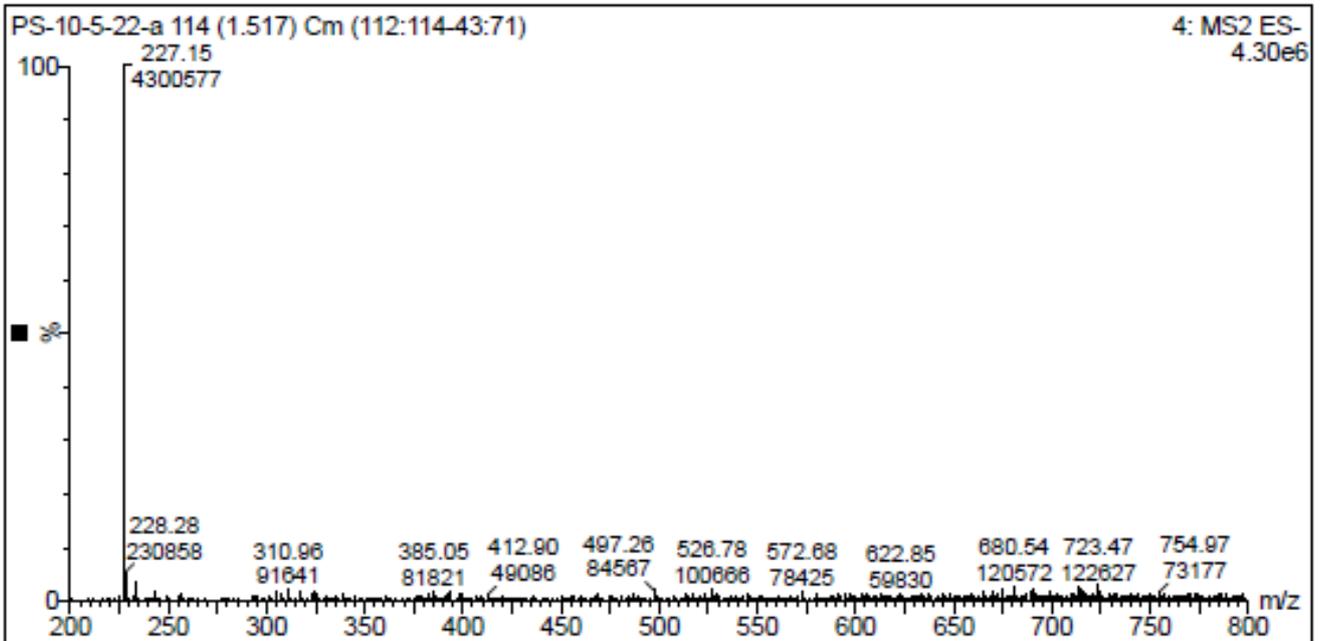
ANEXO III

Cromatogramas modo SCAN
de extractos y espectros de
masas correspondientes

PS-10-5-22-a

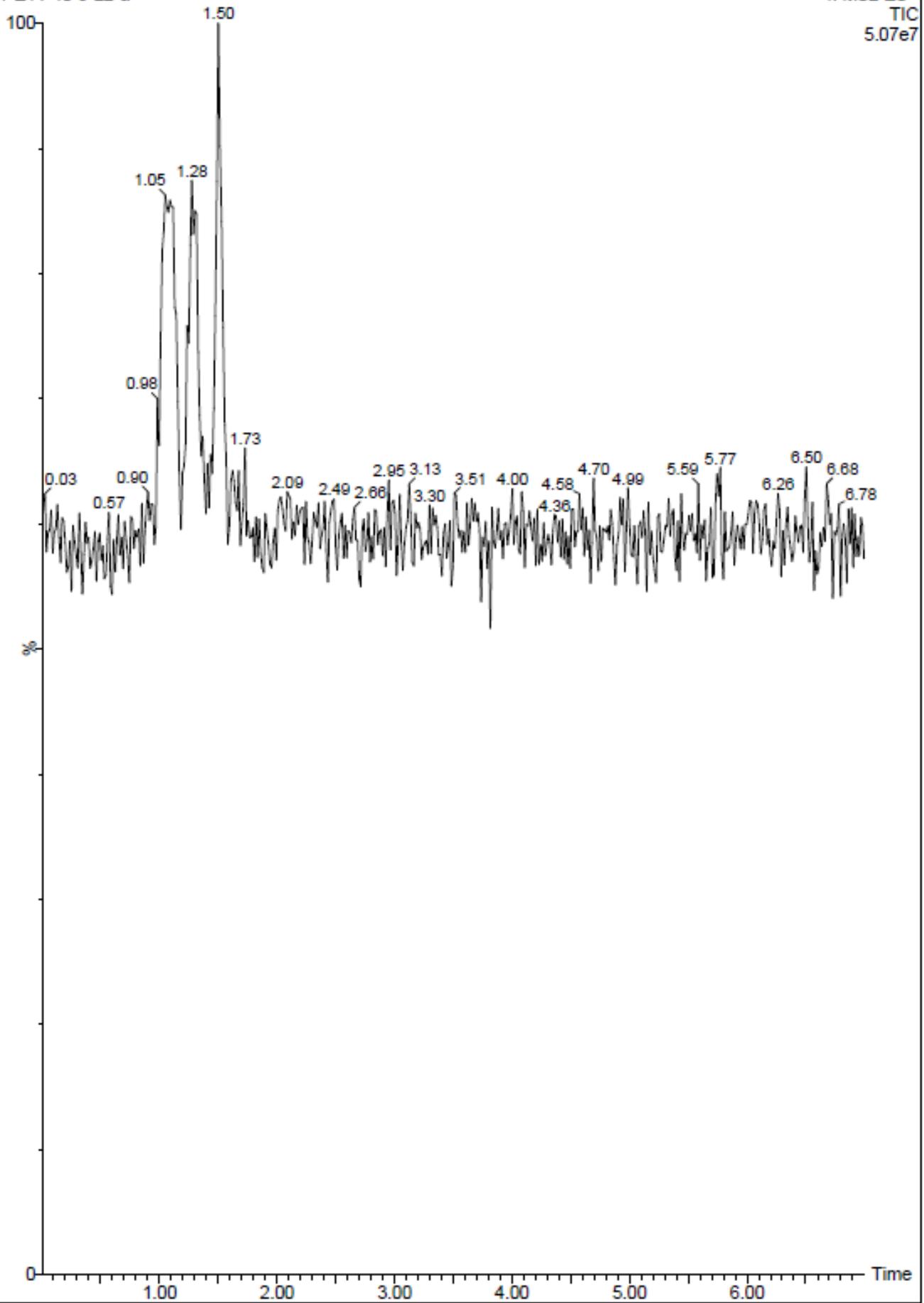
4: MS2 ES-
TIC
4.33e7

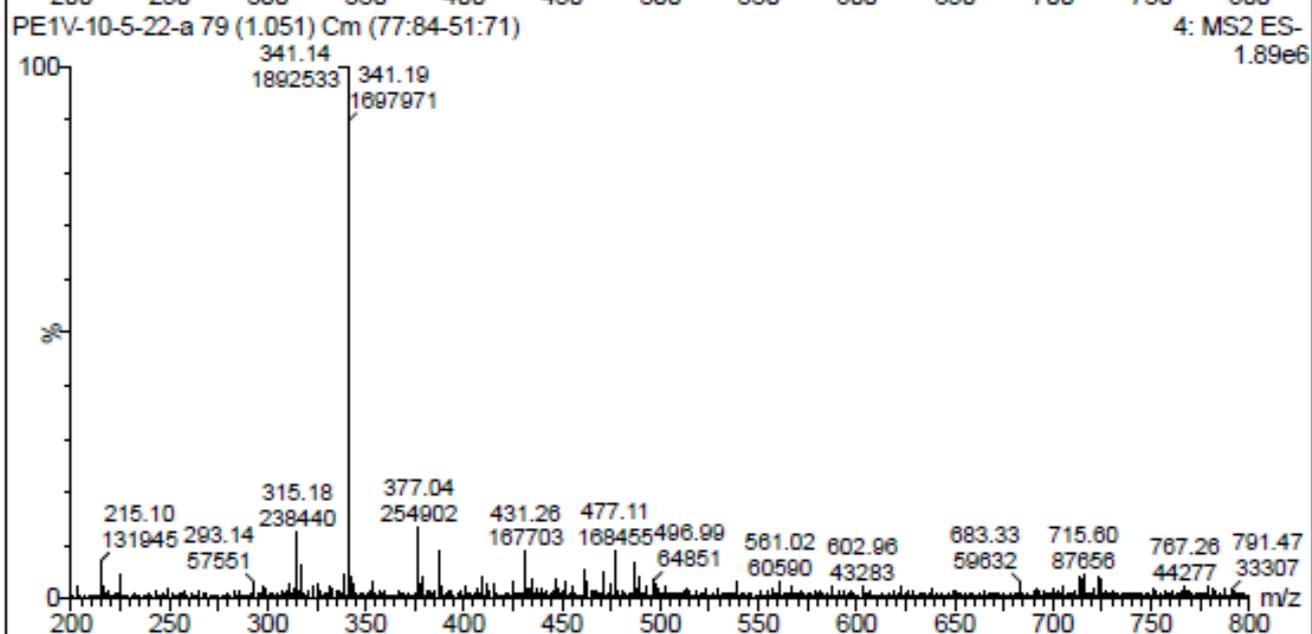
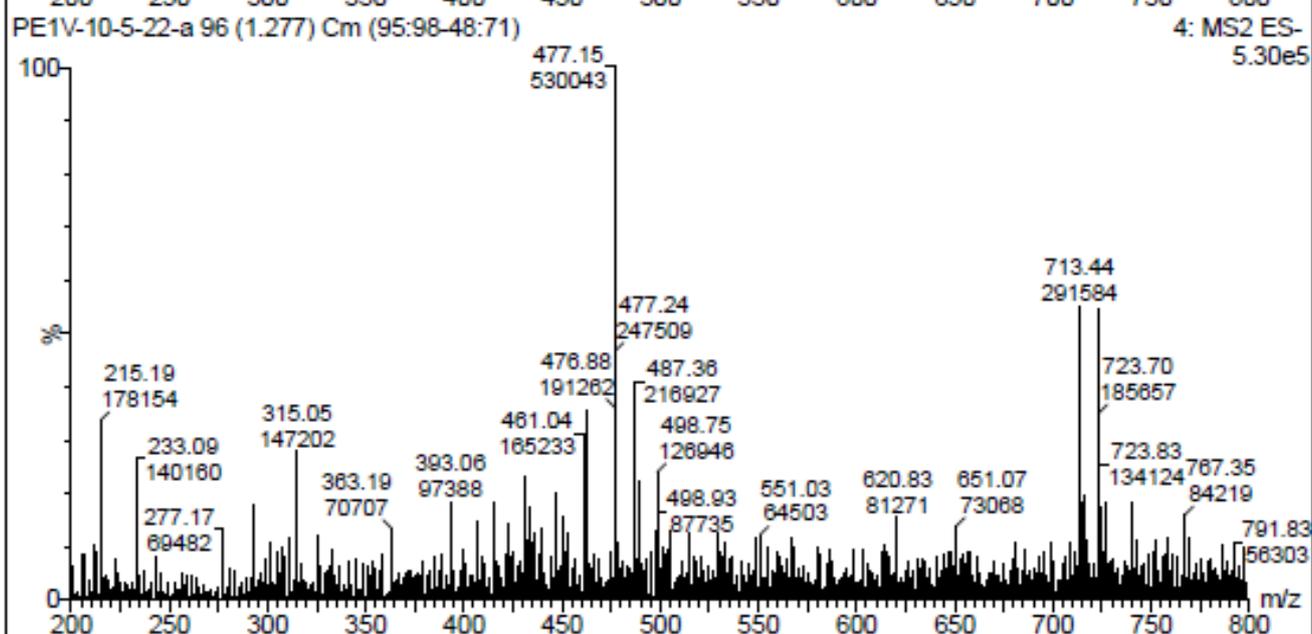
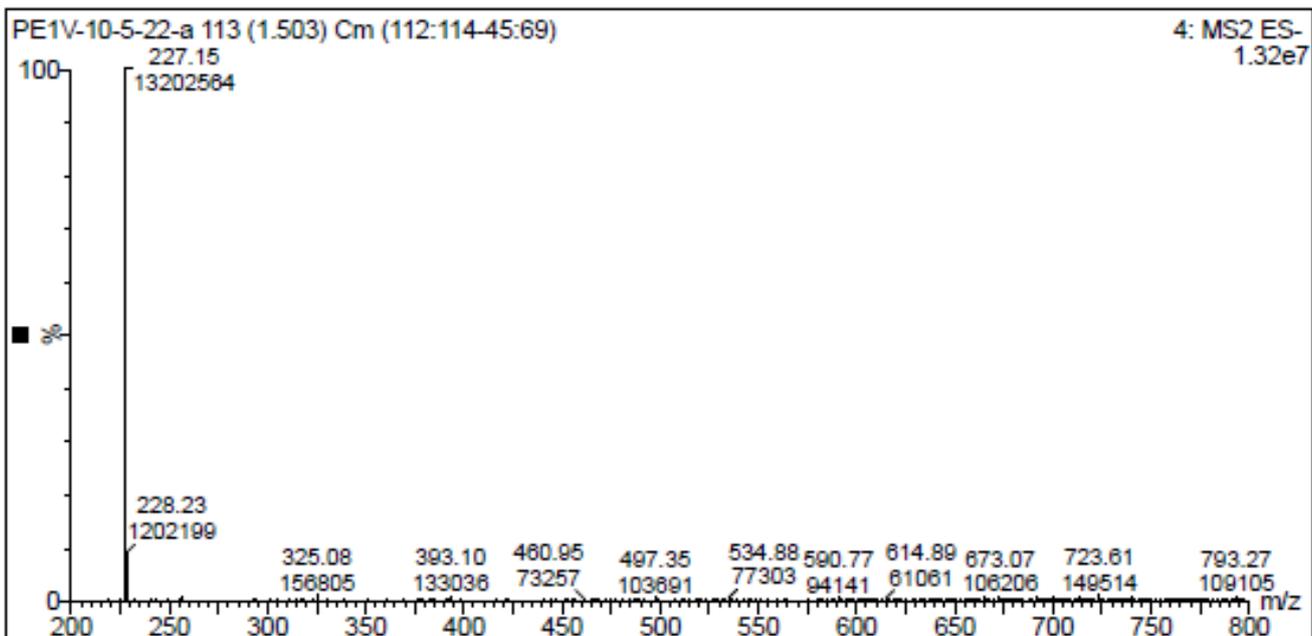


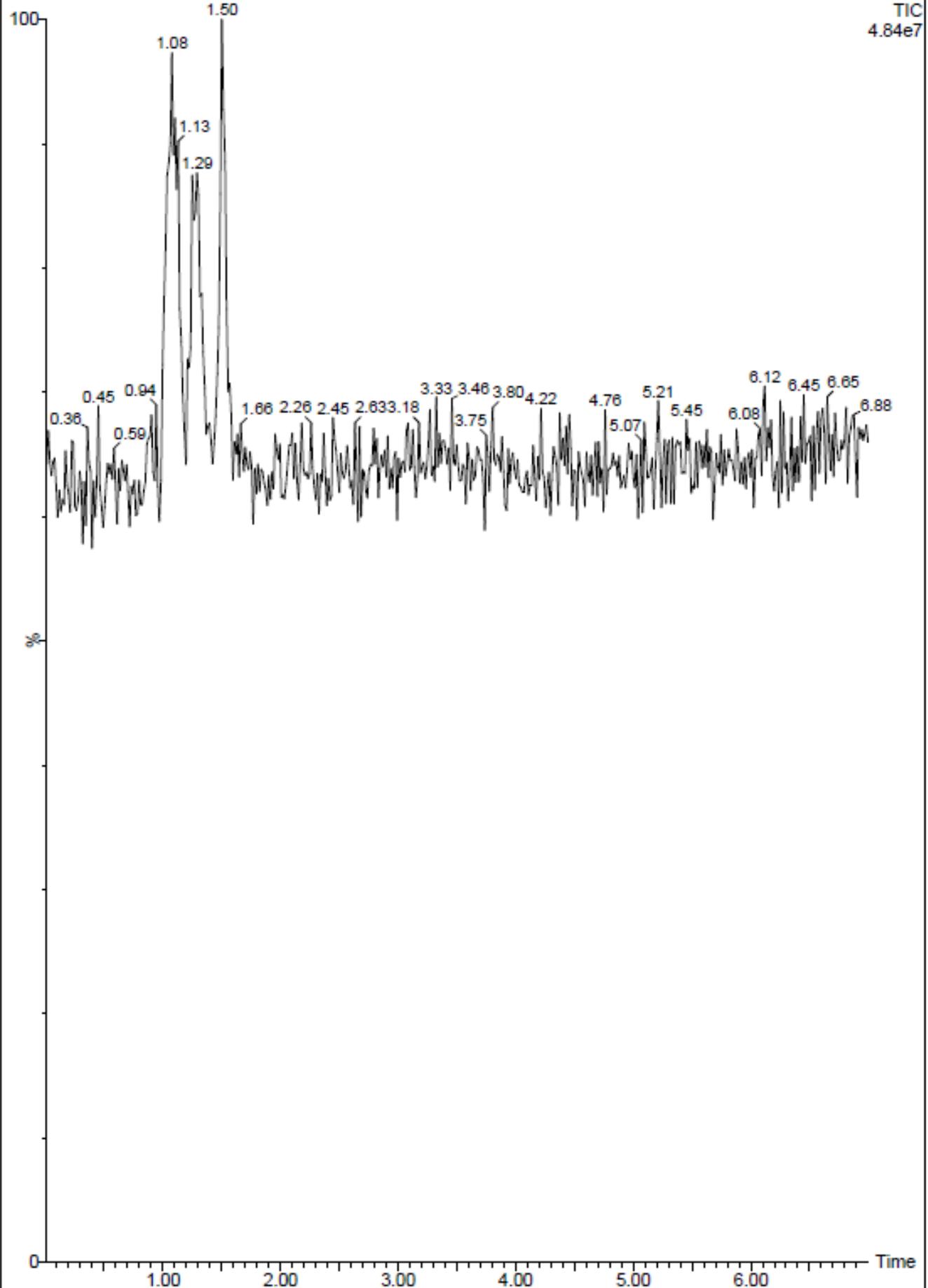


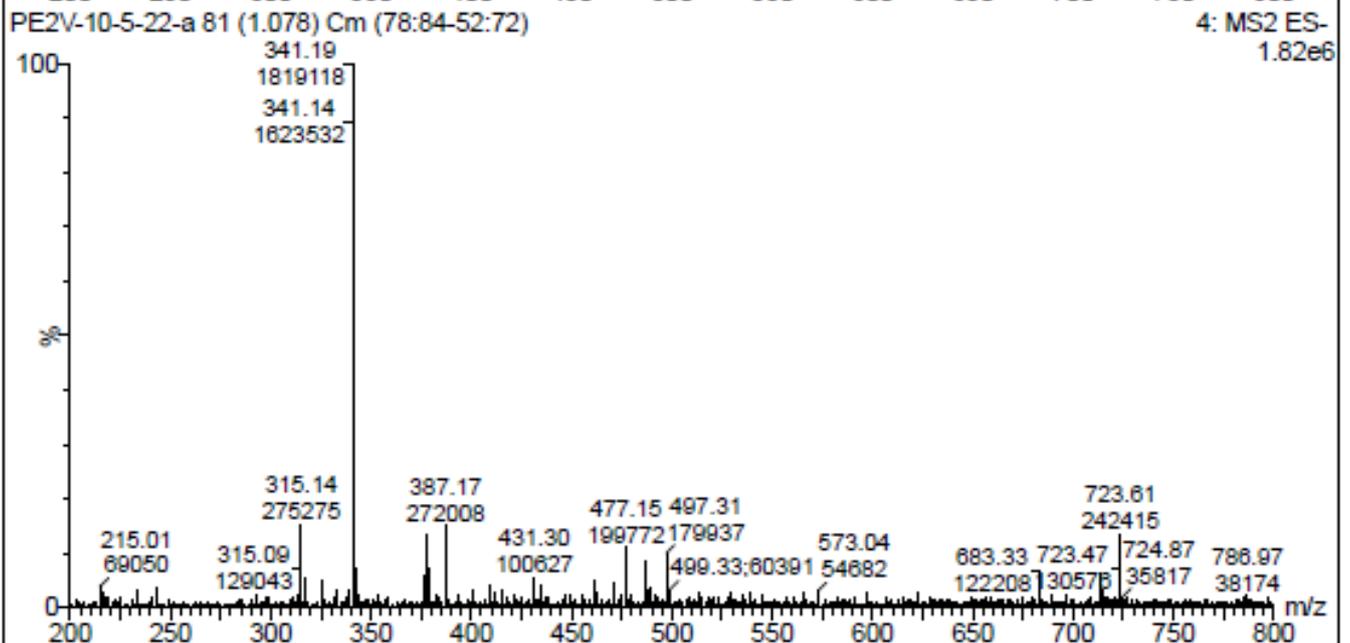
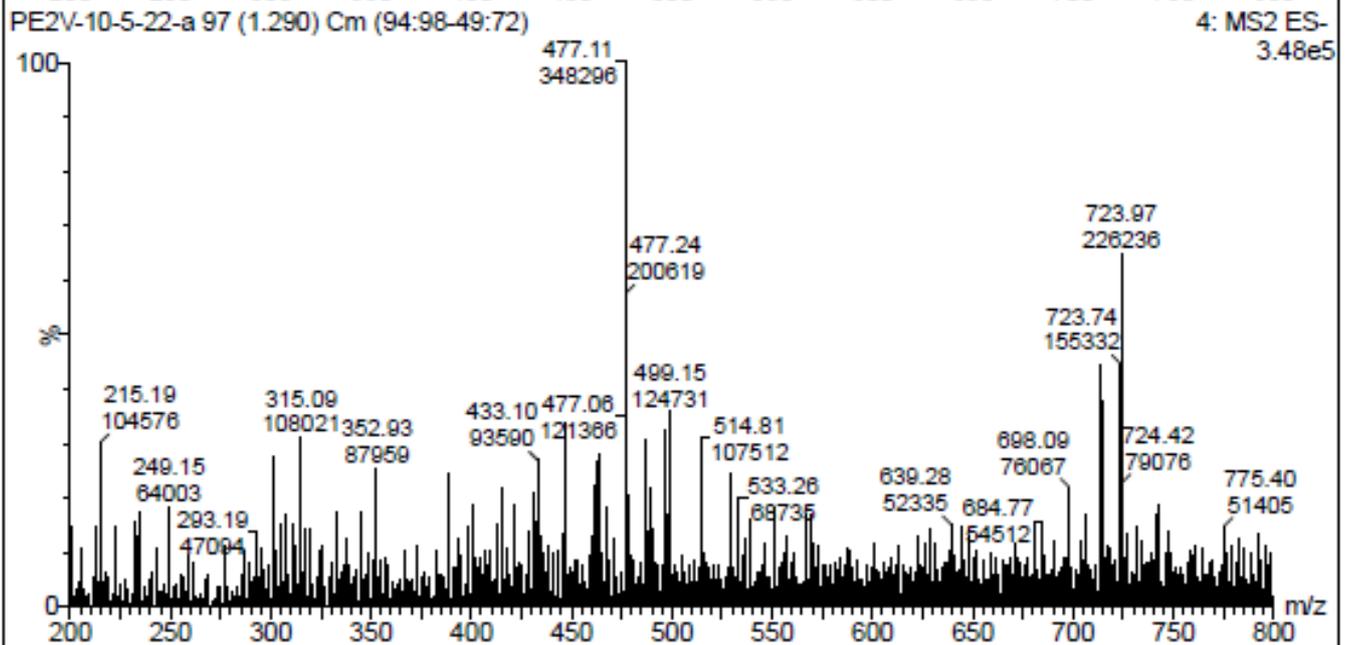
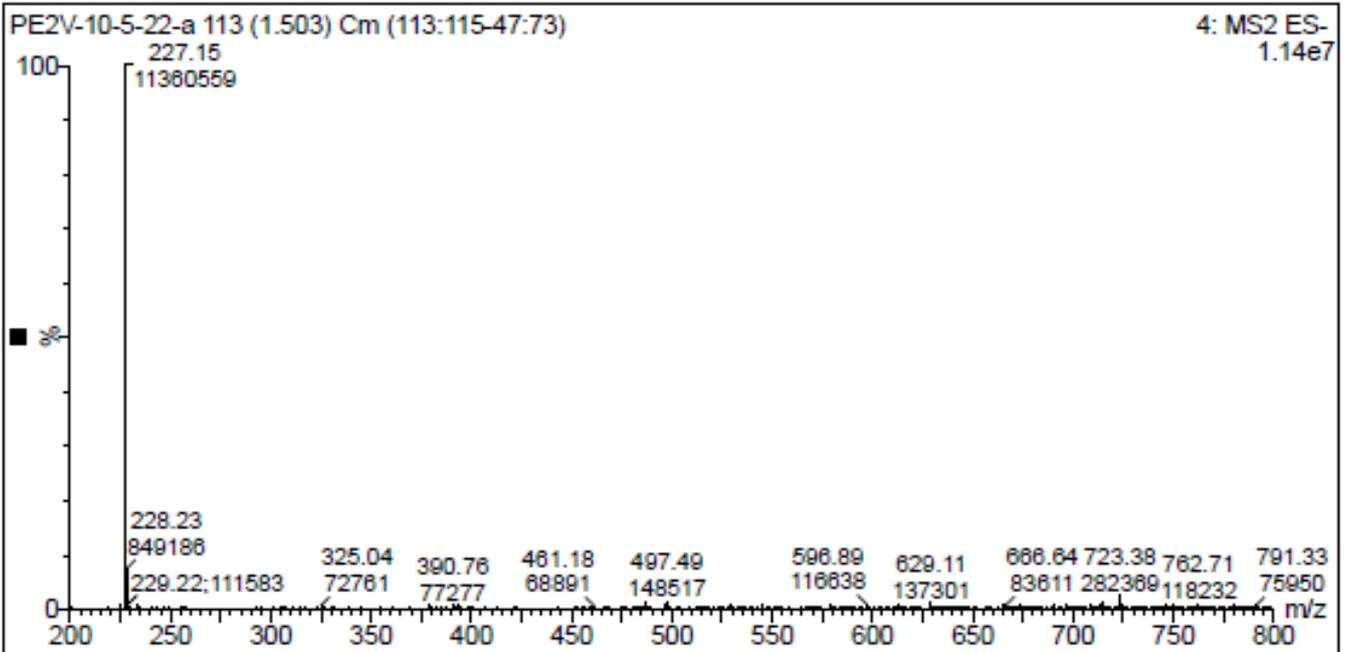
PE1V-10-5-22-a

4: MS2 ES-
TIC
5.07e7



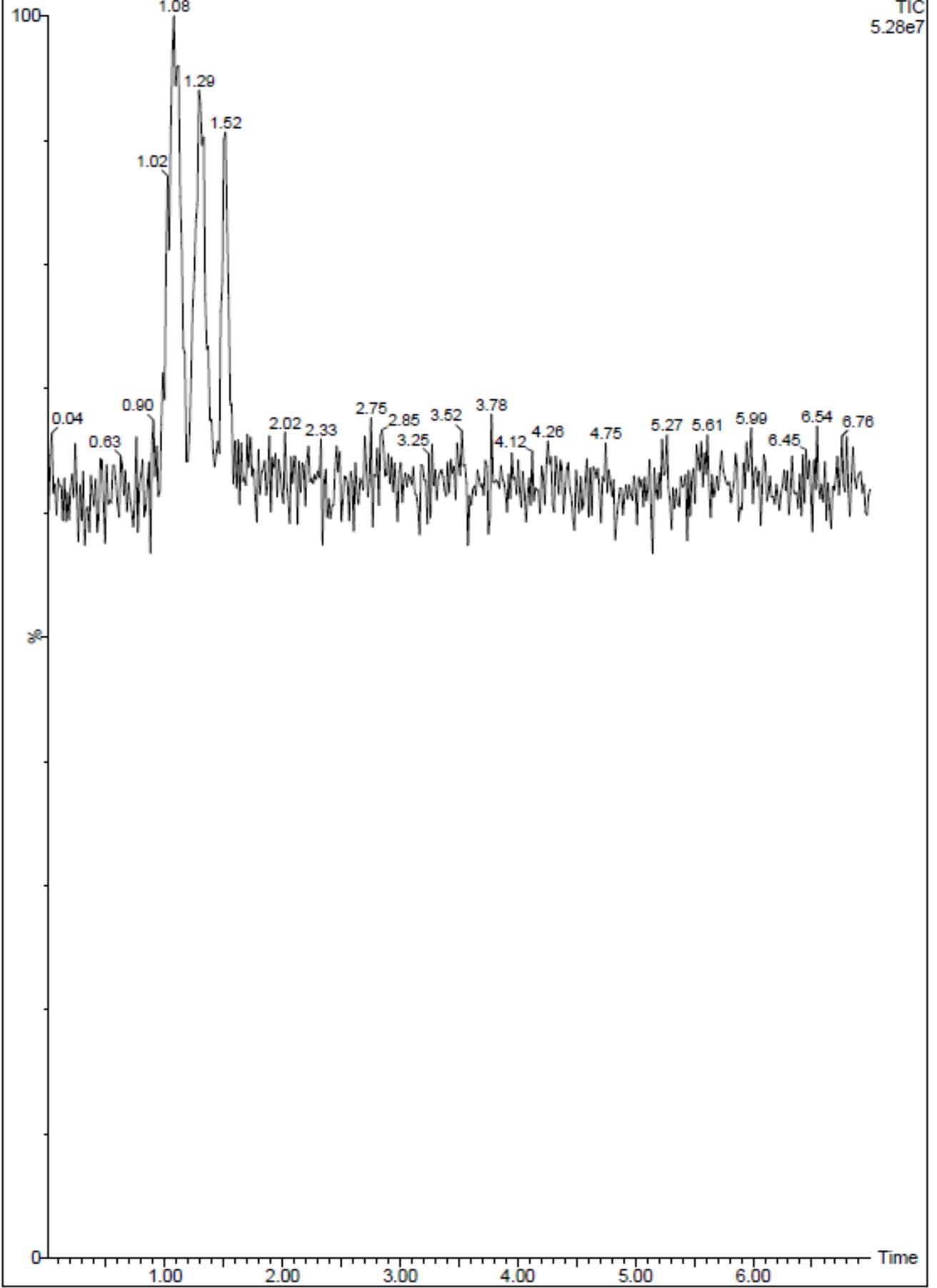


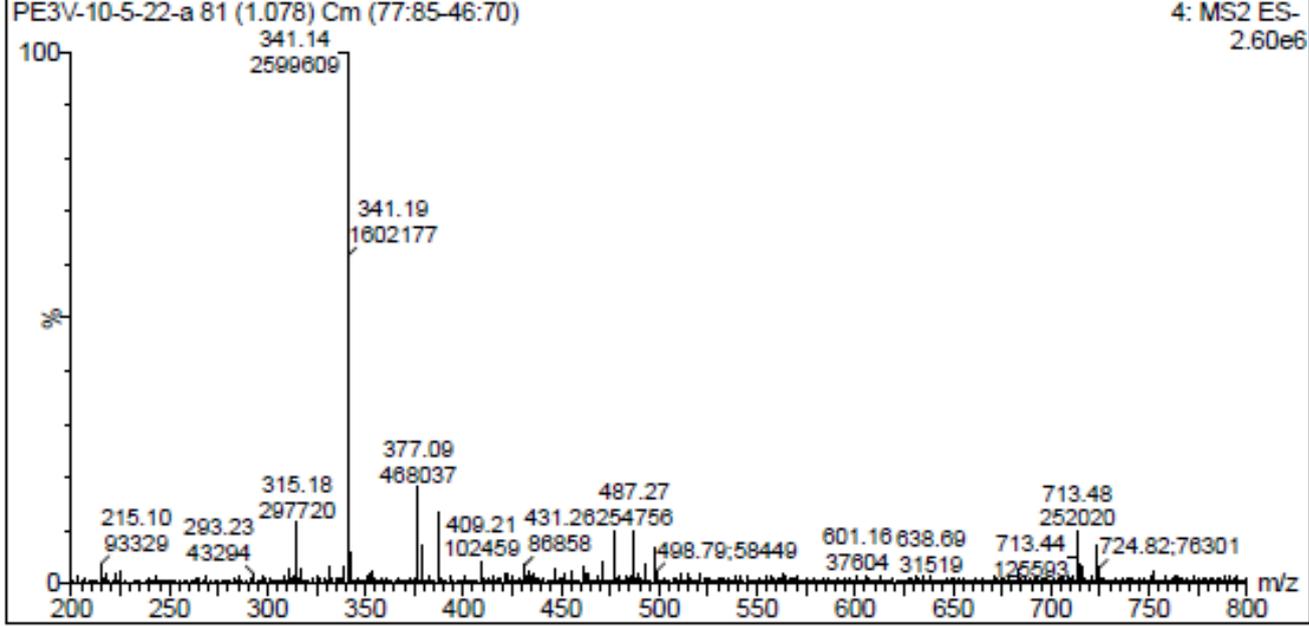
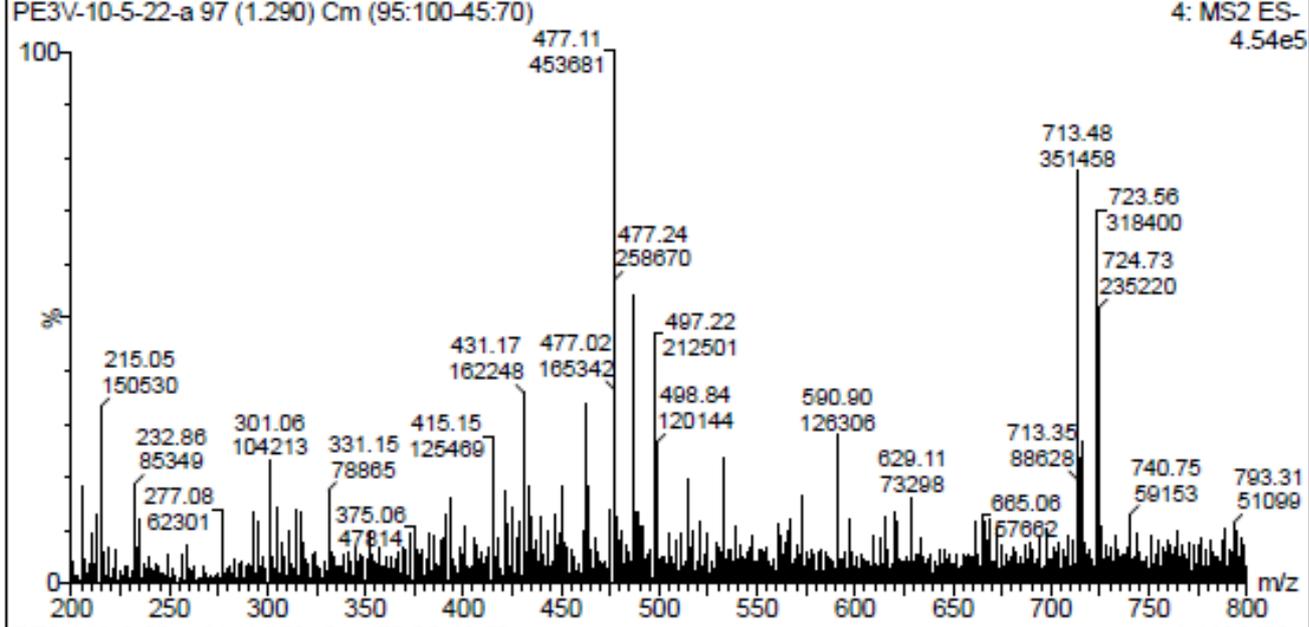
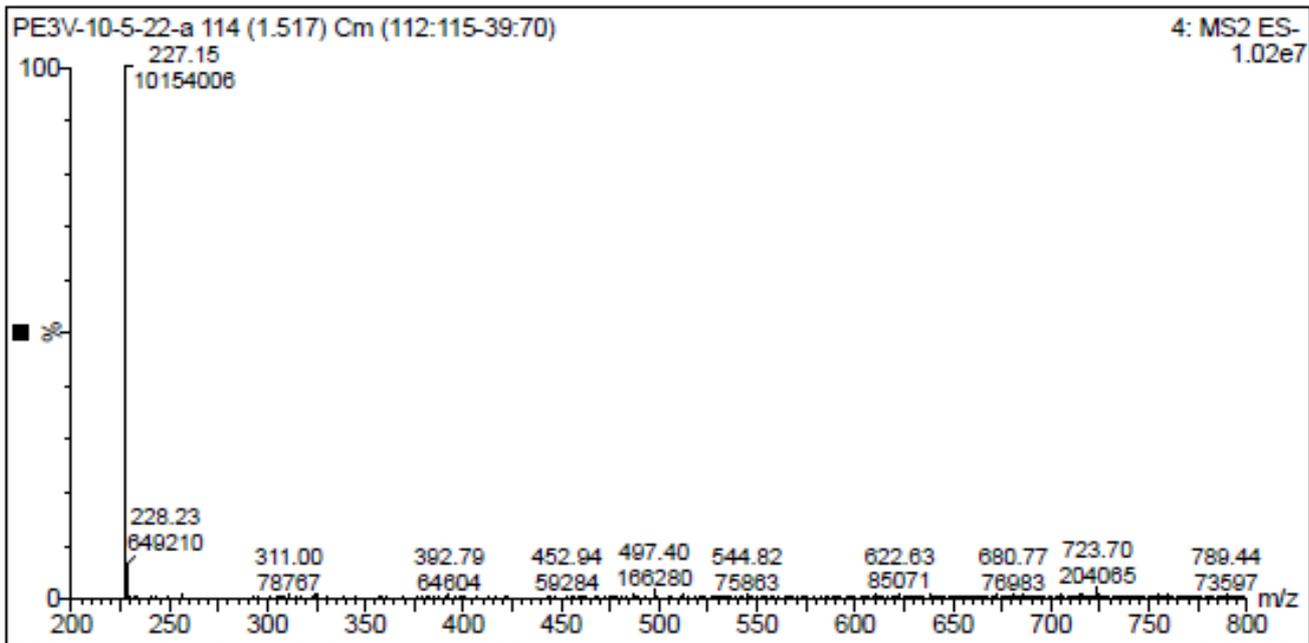




PE3V-10-5-22-a

4: MS2 ES-
TIC
5.28e7





Este trabajo está bajo licencia [CC BY-NC-SA 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)© por Sheila Sofía Murúa Rodríguez

Esta página está disponible en los siguientes idiomas:



Abstract Licencia Creative Commons

**Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0
Internacional (CC BY-NC-SA 4.0)**

Este es un resumen legible por humanos de (y no un sustituto) de la licencia .

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

Adaptar — remezclar, transformar y construir a partir del material

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar crédito de manera adecuada , brindar un enlace a la licencia, e indicar si se han realizado cambios . Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con propósitos comerciales .



CompartirIgual — Si remezcla, transforma o crea a partir del material, debe distribuir su contribución bajo la misma licencia del original.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una excepción o limitación aplicable .

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como publicidad, privacidad o derechos morales pueden limitar la forma en que utilizan el material.