

INHIBIDORES DE PROTEASAS Y SU ROL EN LA RESISTENCIA DE MANI A LA CONTAMINACION DE AFLATOXINAS

Asis Ramón, Muller Virginia y Aldao Mario.

Dto. Bioquímica Clínica-CIBICI. Fac. Ciencias Químicas -CONICET, UNC

La detección e identificación de inhibidores de proteasas (IP) en semillas y tubérculos de plantas ha sido extensamente descrita. La función de estos inhibidores en plantas no es bien conocida, se ha postulado que actuarían como proteínas de reserva ya que se acumulan durante la maduración de la semilla o tubérculo, o que regularían la actividad de proteasas endógenas facilitando el almacenamiento de proteínas en la maduración. Otra función que se les atribuye a los IP en plantas es su participación en los eventos de defensa. Se ha descrito que el ataque de insectos aumenta la producción de IP, los cuales inhiben la actividad de proteasas digestivas en el intestino del insecto pudiendo conducir a malnutrición, reducción del crecimiento y en algunos casos su muerte. También se han descrito IP en plantas con actividad antifúngica. Un ejemplo de ello son los inhibidores de cisteíno-proteasas denominados fitocistatinas que han sido aisladas de semillas de girasol, mijo, tabaco; estos inhibidores mostraron ser activos antifúngicos contra patógenos de plantas como *Fusarium Solani* y *Trichoderma reesei*.

En la familia de leguminosas se han descrito numerosos IP. Un inhibidor de tripsina y quimiotripsina del tipo Bowman-Birk aislado de semillas de habas (*Vicia faba*) inhibió el crecimiento de *M. arachidicola*, *F. oxysporum* y *B. cinerea*. El rol del inhibidor de tripsina de soja en la defensa contra *A. flavus* y *A. parasiticus* fue estudiado sin encontrar un efecto antifúngico sobre estos hongos. En semilla de maní se han aislado 5 IP con doble cabeza capaces de inhibir tripsina y quimiotripsina con pesos moleculares entre 5.3 y 7.2 kDa. Los estudios de secuencia de aminoácidos demostraron una alta identidad entre 4 de ellos diferenciándose notoriamente de otros inhibidores de la familia de leguminosas.

De acuerdo a estos antecedentes, en este estudio se propuso investigar si los IP de la semilla de maní participan en la defensa contra la infección de *A. flavus* y *A. parasiticus*. Para ello se evaluó:

1)- El peso molecular y la concentración de IP en las semillas infectadas del genotipo resistente y del susceptible. 2)- La actividad inhibitoria de los IP sobre el crecimiento del hongo.

Materiales y Métodos

Se utilizaron los genotipos **PI337394** y **Florman** (resistentes y susceptibles a la infección por *Aspergillus* respectivamente) provistos por E.E.INTA Manfredi. Las semillas sin tegumento fueron infectadas con una suspensión de 10000 esporas de AP. Los granos fueron incubados a 28-30 grados C durante tres días, sometidos a molienda y el producto fue extraído con AcH 0,05 M para solubilizar los inhibidores. Los inhibidores de proteasas fueron detectados y cuantificados por la inhibición de la tripsina sobre el substrato azocaseína.

La identificación y la determinación de los pesos moleculares de los IP se realizó por Zimografía reversa en un gel con 16,5% de poliácridamida y 0,1% de caseína en un sistema de buffer Tris-Tricina.

Detección de la actividad antifúngica luego de separar los inhibidores por electroforesis: Los inhibidores fueron separados según el procedimiento de zimografía reversa. Una porción del gel que contenía los inhibidores fue incubado a 37° C durante 48 hs con una suspensión de esporas (10000 esp.) en un medio de cultivo que contenía 2% de caseína y 2% de sacarosa. En paralelo otra porción del gel fue revelada de acuerdo al procedimiento de zimografía reversa para identificar la movilidad electroforética de los IP.

Resultados y discusión

En la figura 1 se presenta la actividad inhibitoria de los IP sobre la tripsina en los extractos de semillas sin tegumento que fueron infectadas y en las semillas sin infectar de cada genotipo (blancos). En las semillas sin infectar se puede observar un nivel basal de inhibidores en ambos genotipos, el contenido de IP posterior a la infección aumenta significativamente en el genotipo PI337394, en tanto disminuye en el genotipo Florman

Los ensayos de zimografía reversa revelaron una región del gel que inhibe la actividad de la tripsina como se muestra en la Figura 2. Esta región corresponde a proteínas con un peso molecular entre 6,5 y 14 Kda. Los PM de los IP detectados en este ensayo coinciden con los PM de los IP descriptos previamente en maní, sugiriendo que podrían tratarse de los mismo IP.

La separación de los componentes de los extractos de IP por electroforesis y posterior incubación de los geles con las esporas de AP, muestran una actividad antifúngica causada por los IP produciendo una zona con ausencia de micelio sobre el gel correspondiente a la región de migración de los inhibidores (Figura 3).

Estos resultados revelan que el genotipo resistente produce un aumento en el contenido de proteínas inhibitorias de proteasas, con actividad antifúngica en respuesta a la infección de *Aspergillus parasiticus*. De forma opuesta el genotipo susceptible muestra una disminución del contenido de IP durante la infección. Las diferencias en la generación de IP en respuesta a la infección entre un genotipo susceptible y uno resistente, la actividad antifúngica de los IP, sugiere que la síntesis de IP en semillas de maní responde como una vía de defensa a la infección y estaría asociada a la resistencia de *Aspergillus*.

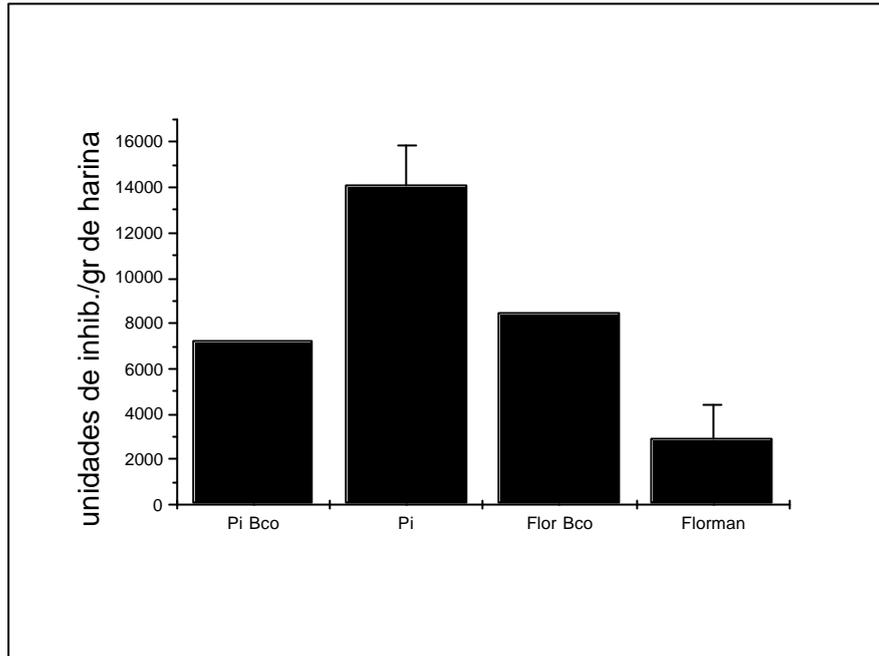


Figura 1- Contenido de IP en harinas de semillas blancos (Bco) e infectadas por AP en los genotipos PI337394 (PI) y Florman .

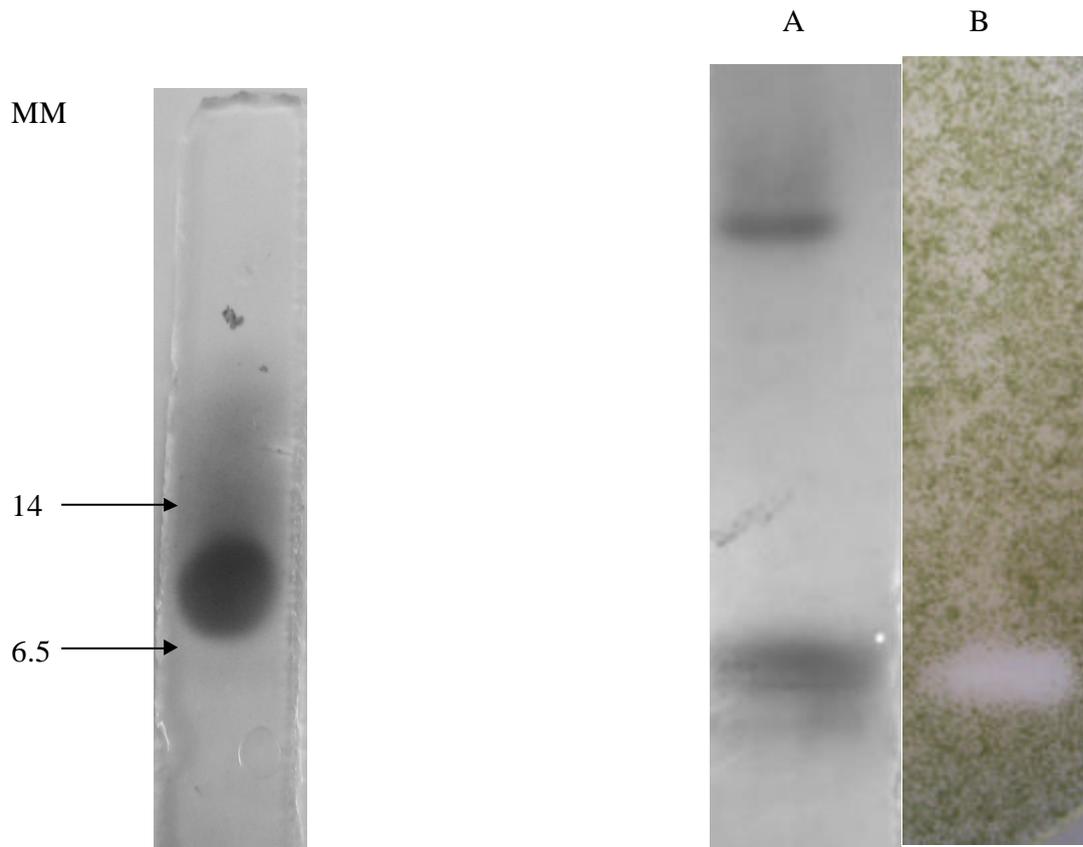


Figura 2- Zimografía reversa: los IP son separados en un gel copolimerizado con caseína, y posteriormente es incubado con tripsina. La región con tinción revela la presencia de IP. MM: marcadores de peso molecular

Figura 3- A: zimografía reversa de IP. B- fracción de gel con IP separados por electroforesis e incubados con esporos de *Aspergillus*/caldo caseína-sacarosa.