

# VÍA DE LIPOXIGENASA EN LA DEFENSA DE *ARACHIS HYPOGAEA* EN LA INFECCIÓN CON *ASPERGILLUS*

Müller, V<sup>1</sup>., Gioco, J<sup>2</sup>., Asis, R<sup>1</sup>.

1-Cátedra Bromatología, Depto. Bioquímica Clínica-CIBICI, Fac. Cs. Qs., UNC. 2-Biotecnología EEA Manfredi-INTA.  
rasis@fcq.unc.edu.ar

## Introducción

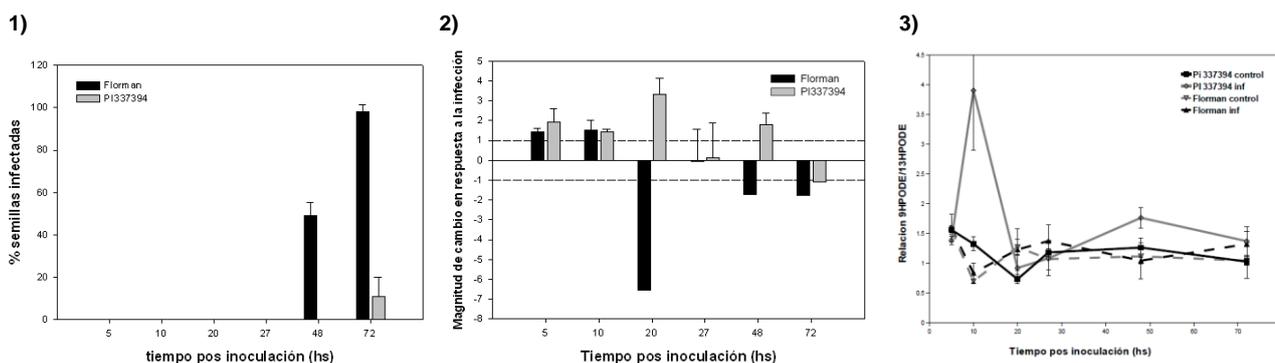
Los hongos aflatoxigénicos *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* infectan las semillas de maní tanto en la pre como en la pos cosecha, afectando la calidad de la semilla y produciendo pérdidas económicas. Las aflatoxinas son metabolitos secundarios sintetizados por el género *Aspergillus*, especies *flavus* y *parasiticus* casi exclusivamente. Estas sustancias tóxicas han sido identificadas como hepatotóxicas y cancerígenas. La contaminación de aflatoxinas en campo se ve afectada directamente por las condiciones ambientales, y por diferencias en la susceptibilidad al enmohecimiento y producción de aflatoxinas entre distintos genotipos de maní. Se han establecido las condiciones climáticas específicas que promueven la contaminación de aflatoxina, sin embargo existe escasa información sobre los mecanismos de resistencia de la planta a la contaminación. La comprensión de estos mecanismo permitirá abordar estrategias para incorporar una resistencia o tolerancia a la contaminación de aflatoxinas en cultivares elite. Con estos fines iniciamos un estudio de las bases bioquímica y moleculares de los mecanismos de defensa de la semilla de maní en respuesta a la infección por *Aspergillus* productores de aflatoxinas. Una de las vías de defensas de nuestro interés es la de lipoxigenasa. Esto resulta de interés debido a que en ella se sintetiza el ácido jasmónico que es una hormona de gran importancia en la regulación de las defensas en las plantas. En los últimos tiempos se ha descubierto que esta vía genera, además de jasmonico, un gran número de compuestos que estarían involucrados en la defensa de plantas o su regulación. También se ha descrito que hidroperóxidos de acidos grasos, productos directos de la lipoxigenasa, inciden en la esporulación de *A. flavus* y *A. parasiticus* y en la producción de aflatoxinas. En estudios previos en nuestro grupo, se identificaron en semillas de maní ácidos grasos hidroxilados antifungicos generados en la vía de la lipoxigenasa como respuesta a la infección. Por lo tanto el objetivo del presente trabajo fue estudiar a nivel bioquímico y molecular la vía de la lipoxigenasa (LOX) en respuesta a la infección con *Aspergillus parasiticus*.

## Materiales y Métodos

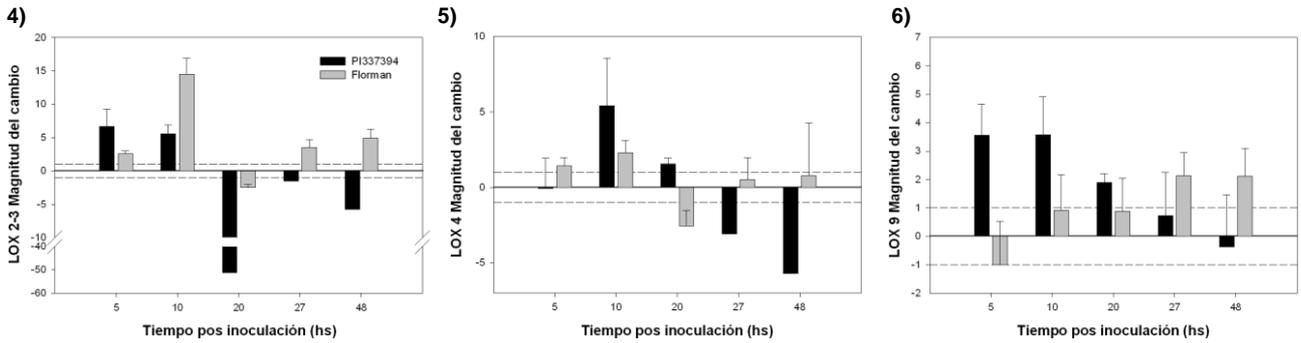
Para este estudio se emplearon semillas de los genotipos Florman y PI337394, caracterizados como susceptible y resistente a la infección respectivamente. A los fines de evaluar la vía de la LOX, se realizó un ensayo de cinética de infección, donde las semillas desinfectadas y rehidratadas fueron infectadas con una solución de esporas de  $1 \times 10^4$  esp./ml. e incubadas a 28° C durante: 5hs., 10hs., 20hs., 27hs., 48hs. and 72hs. La actividad de LOX fue determinada espectrofotométricamente a 234nm, utilizando ácido linoléico como sustrato de la enzima. La estereoespecificidad de las LOX fueron evaluadas midiendo los productos de la reacción con el ácido linoléico (hidroperóxidos (HPODE)) por SP-HPLC, previa reducción de los hidroperóxidos a hidroxiácidos. Las aflatoxinas fueron extraídas con una mezcla metanol:agua (80:20v/v), y posteriormente purificadas con columnas de florosil, para ser cuantificadas por HPLC (equipado con una columna C<sub>18</sub> y detector de fluorescencia). La expresión génica fue cuantificada mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real, utilizando como gen de referencia histona H3. Los genes candidatos para ser analizados, fueron una 9-LOX (LOX5) y dos 13-LOX (LOX2-3 y LOX4).

## Resultados

Al analizar los resultados, fue posible observar una marcada diferencia en la infección entre los genotipos (Figura 1) con un marcado enmohecimiento de las semillas del genotipo Florman a partir de las 48 hs, confirmando las diferentes susceptibilidades a la infección con *Aspergillus*. La contaminación con aflatoxinas a las 72hs pos inoculación fue de 300 y 10 ppb para Florman y PI337394 respectivamente. La actividad de LOX se indujo en las primeras horas infección en ambos genotipos como respuesta a la infección, pero a partir de las 20 hs presento un patrón de respuesta diferenciado con una fuerte represión de LOX en Florman y una fuerte inducción en PI337394 (Figura 2).



El análisis de la composición de isómeros hidroperóxidos del ácido linoléico definida como la relación de isómeros 9-HPODE y 13-HPODE (Figura 3), muestra diferencias significativas en los diferentes tiempos pos inoculación, evidenciando la formación de distintas isoenzimas de LOX en las semillas de los genotipos durante la infección.



El análisis de expresión génica demostró que la expresión de los genes LOX 2-3 y 4, de producción predominante de 13 HPODE, presento en ambos genotipos una inducción en las primeras 10 horas de infección y una respuesta opuesta a partir de las 20 horas (Figura 4 y 5), mostrando un patrón de respuesta similar al de la actividad de LOX (Figura 2). La expresión de LOX5, de producción predominante de 9-HPODE, presento en el genotipo PI337394 una fuerte inducción como respuesta a la infección en las primeras 20 horas de infección, explicando en parte el aumento de la relación de 9/13 HPODE en esos tiempos (Figura 3). En tanto que en el genotipo Florman presento una inducción de menor intensidad a partir de las 27 hs pos inoculación. Estos resultados muestran un patrón de respuesta diferencial a nivel bioquímico y genético entre los genotipos, que ponen en evidencia la participación de esta vía en la infección de la semilla y su asociación con la resistencia a la infección de *Aspergillus*.