

ESTUDIO DEL ESTADO OXIDATIVO Y DEL PERFIL DE OXILIPINAS Y POLIFENOLES EN EXTRACTOS DE CLAVOS DE MANÍ INDUCTORES DE LA GERMINACIÓN DE ESPORAS DE *THECAPHORA FREZII*

Mary VS, Velez PA, Rodriguez MG, Rubinstein HR, Theumer MG.

Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Químicas. Departamento de Bioquímica Clínica. Microbiología de los Alimentos. CIBICI (UNC-CONICET). Córdoba, Argentina.

vmary@fcq.unc.edu.ar

Introducción

El maní es atacado por *Thecaphora frezii*, un hongo que se encuentra en los suelos en su forma de resistencia, las teliosporas, que germinan para penetrar los ginóforos o “clavos” en el suelo e invadir las vainas y sus frutos en desarrollo, colonizándolas hasta transformarlas en una masa carbonosa. El conocimiento actual sugiere fuertemente que los mecanismos de infección están cifrados en la comunicación química en ambos sentidos entre los clavos y las teliosporas, entonces, componentes liberados por los clavos podrían inducir la germinación de las esporas de *T. frezii* ubicadas en sus proximidades, y a su vez, estas últimas podrían liberar compuestos que debiliten la inmunidad vegetal [1]. Teniendo en cuenta que en las plantas las especies reactivas de oxígeno, diversas oxilipinas y polifenoles funcionan como señales bioquímicas para regular la defensa contra el estrés biótico y abiótico [2], en este trabajo se plantea estudiar el estado oxidativo, así como los perfiles de oxilipinas y polifenoles de extractos inductores de la germinación de teliosporas, provenientes de clavos de plantas de maní susceptibles o inmunes a *T. frezii*. Así como también, determinar las posibles modificaciones de estos parámetros por la interacción de dichas plantas con las teliosporas en el suelo.

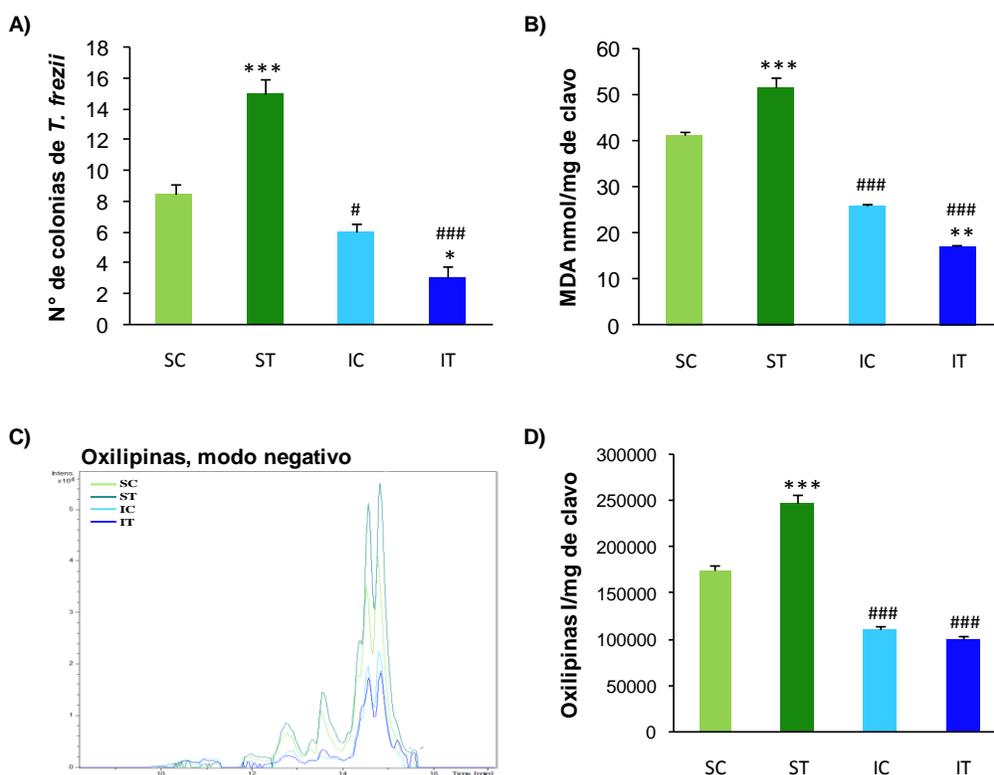
Materiales y Métodos

Para cumplir con los objetivos propuestos se prepararon extractos de clavos de maní de variedades susceptibles e inmunes a *T. frezii*, cultivadas en suelos contaminados o no por las teliosporas, con hexano, acetato de etilo, metanol y metanol ácido, a los fines de separar los compuestos de diferente polaridad. La germinación de las teliosporas se evaluó en cultivos en medio Murashige y Skoog (M&S) al que se le agregaron los diferentes extractos de clavos (2%). Luego, en los extractos inductores de la germinación de las esporas de *T. frezii* se analizaron los perfiles de oxilipinas y polifenoles (flavonoides: quercetina, kaempferol, kaempferol-coumaroil glucósido, catequina y epicatequina; estilbenoides: resveratrol, isopentadienilresveratrol, araquidín 1 y araquidín 2; ácidos fenólicos: ácido felúrico, ácido cumárico, ácido sinápico, ácido quínico, ácido caféico y ácido elálgico) mediante HPLC/MS. Además, en los clavos de ambas variedades de maní cultivadas en suelos contaminados o no por las teliosporas se determinaron los niveles de malondialdehído (MDA), como un biomarcador de estrés oxidativo, por HPLC/UV.

Resultados

Los resultados evidenciaron que todos los extractos acetato de etilo AE tuvieron capacidad para inducir una temprana germinación de las esporas de *T. frezii*, a partir de los 5 - 7 días, así como de estimular la filamentización y formación de colonias. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas entre los extractos AE, observándose mayor poder germinativo en los extractos provenientes de clavos de plantas susceptibles expuestas a las teliosporas (ST), seguido de los extractos de plantas susceptibles control (SC), plantas inmunes control (IC) y cultivadas en presencia de esporas de *T. frezii* (IT) (Fig 1A). Además, los datos mostraron que los clavos de plantas susceptibles poseen niveles de MDA significativamente mayores a los clavos de las plantas inmunes, y dichos niveles aumentan o disminuyen por la presencia de teliosporas en el suelo en las plantas susceptibles e inmunes, respectivamente (Fig. 1B). De manera similar, los niveles de oxilipinas encontrados en los extractos AE de clavos provenientes de plantas susceptibles fueron significativamente mayores a los hallados en los extractos de plantas inmunes, y la exposición de las primeras a las teliosporas indujo un incremento significativo en los niveles de oxilipinas (Fig 1C y 1D). Por otra parte, el análisis de polifenoles evidenció principalmente diferencias cuantitativas más que cualitativas, en los extractos AE de clavos de plantas susceptibles e inmunes. La presencia de teliosporas en el suelo provocó una disminución en los niveles de flavonoides y ácidos fenólicos en las dos variedades de plantas, y un aumento en los niveles de estilbenoides en las plantas susceptibles, ocasionando una disminución neta en los niveles de polifenoles de ambas variedades de plantas, que fue más pronunciada en las plantas inmunes (Tabla 1).

Con los hallazgos obtenidos en este trabajo se puede concluir que las teliosporas contaminantes de los suelos podrían inducir cambios en la señalización bioquímica de los clavos de variedades susceptibles a *T. frezii*.



frezii, mediante la alteración del estado oxidativo y del perfil de oxilipinas, que podrían favorecer la germinación de las esporas y la posterior invasión fúngica. Además, la disminución de los polifenoles inducida por las teliosporas contaminantes de los suelos, principalmente observados en las plantas inmunes a *T. frezii*, evidenciaron cambios en el metabolismo secundario, los cuales son frecuentes en las respuestas de defensa de las plantas, en las que se inducen enzimas que oxidan a los polifenoles e incrementan la resistencia contra la invasión de patógenos. Los resultados sugieren que la interacción de las teliosporas con las plantas susceptibles, podría debilitar la respuesta inmune vegetal, para favorecer la invasión de *T. frezii* en los clavos, ya que la síntesis de oxilipinas y estilbenoides (fitoalexinas) está asociada al desarrollo de una respuesta sistémica inducible, la cual contrasta con la respuesta sistémica adquirida eficiente en la defensa de las plantas contra la invasión de patógenos biotróficos, como *T. frezii*.

Figura 1: A) El gráfico muestra el N° de colonias de *T. frezii* luego de 20 días de cultivo de las teliosporas en medio M&S con extractos AE de clavos de plantas susceptibles cultivadas en ausencia (control, SC) o presencia de teliosporas (ST) en el suelo, o de plantas inmunes crecidas en suelos contaminados o no con las esporas de *T. frezii*, IT e IC, respectivamente. B) El gráfico expone los niveles de MDA por mg de clavos provenientes de ambas variedades de plantas, expuestas o no a las teliosporas. C) Histogramas representativos de los perfiles de oxilipinas de los extractos AE de los clavos provenientes de plantas SC, ST, IC e IT, obtenidos por HPLC/MS en modo negativo. D) El gráfico muestra los niveles de oxilipinas por mg de tejido encontrados en los extractos AE de clavos provenientes de plantas susceptibles e inmunes, cultivadas en suelos contaminados o no con las esporas de *T. frezii*. *Indica diferencias entre las plantas control y expuestas a las teliosporas, de la misma variedad. #Indica diferencias entre las plantas susceptibles e inmunes, que recibieron el mismo tratamiento. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; # $p < 0,05$; ### $p < 0,001$.

Tabla 1: Perfil de polifenoles de extractos AE de clavos obtenidos a partir de plantas susceptibles e inmunes, cultivadas en suelos contaminados o no con las esporas de *T. frezii*, determinado por HPLC/MS.

Bibliografía

- [1] Rago AM, Cazon LI, Paredes JA, Molina JPE, Conforto EC, Bisonard EM, Oddino C. 2017. *Plant Dis.* 101, 400-408.
 [2] Christensen SA, Kolomiets M V. 2011. *Fungal Genet. Biol.* 48, 4-14.

Financiamiento: Gobierno de la Provincia de Córdoba, Ministerio de Ciencia y Tecnología de Córdoba: "Proyectos Especiales 2019, Grupo Asociativo THECA-FREE"; y PID 2018. ANPCyT-FONCyT: PICT 2015-2810. SeCyT-UNC: Proyectos Consolidar 2018-2021. CONICET.

