

EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA “*IN VITRO*” E “*IN VIVO*” DE BIOPRODUCTOS OBTENIDOS A PARTIR DE LA FERMENTACIÓN DE MIELES FINALES.

Araíz Gallo¹, María de los Ángeles Zardón², Josefa V. Hormaza¹, Yatalí Montero-Sánchez¹, Leonor Sabina¹, Isabel Alfonso², Marta Arias³, Javier Delgado², Juana M. Chanfón¹, Carlos Zayas², y María La O².

- 1. Instituto de Investigaciones Azucareras, Carretera Cujae Km 2 ½, Boyeros, La Habana, Cuba**
- 2. Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar, Carretera Cujae Km 2½, Boyeros, La Habana, Cuba**
- 3. Facultad de Agronomía. Universidad de Tucumán, Argentina.**

Introducción

Desde la germinación de sus semillas las plantas crecen en un lugar específico y son incapaces de escapar de las condiciones desfavorables que puedan aparecer (Rietz y Parker, 2007). Debido a esto son altamente vulnerables a las enfermedades, tanto a las ocasionadas por factores bióticos como a las producidas por factores abióticos.

Como resultado de la interacción entre plantas y patógenos han surgido estrategias que les permiten a las plantas reconocer potencialmente al patógeno que las está invadiendo y desencadenar una defensa exitosa. De la misma manera, los patógenos han ido desarrollando los mecanismos que les posibilitan evadir y/o suprimir las respuestas defensivas de la planta. La influencia de esta presión selectiva sobre la planta ha conllevado al perfeccionamiento de sus mecanismos de defensa. Como consecuencia de esto, el éxito del patógeno para causar una enfermedad, lejos de constituir la regla, es una excepción (Staskawics, 2001; Godfrey y col. 2009).

La defensa de las plantas a patógenos incluye varias respuestas que pueden ser preformadas y otras inducidas. Los componentes de estos sistemas usualmente incluyen polímeros específicos de paredes celulares y mezclas de metabolitos secundarios y proteínas o péptidos con capacidad antimicrobiana. La eficiencia de estas barreras contra el ataque a patógenos, así como la reacción que desencadena la respuesta inducida está determinada por el potencial de infección del patógeno (Orsomando y col., 2001). Los compuestos que inducen reacciones de defensa en las plantas son conocidos como elicitores, la mayoría de estos son derivados de componentes de la superficie celular de microorganismos patógenos o compuestos de bajo peso molecular producidos por ellos (Yamaguchi y col., 2000; Galletti y col, 2008). Estos elicitores también pueden resultar de la degradación de la pared celular de la planta como resultado de la acción de enzimas producidas por el patógeno. Entre las señales elicitoras de reacciones de defensa procedente de la pared celular de las células vegetales se encuentran los oligosacáridos β (1-3,1-6)-glucanos, quitina y oligómeros quitosano, glicopéptidos, fosfolípidos y ácidos grasos como el araquidónico. Todos ellos han sido identificados como potenciales elicitores capaces de desencadenar la cascada de eventos que permite la activación de genes de defensa (Galletti y col, 2008; Chakravarthy y col. 2009; Zurbriggen y col. 2010).

Estos elicitores son responsables de la activación de las respuestas inducibles como resultado de la rápida reprogramación del transcriptoma a partir del reconocimiento de la presencia del patógeno (Walley y Desheh 2010). Entre las respuestas involucradas en el reconocimiento y eventos de señalización iniciales se encuentran: la despolarización de la membrana, reacciones oxidativas y reacción hipersensible (Torres 2010).

Los cambios en el flujo de iones H^+ , K^+ , Cl^- y Ca^{2+} a través de la membrana plasmática y la formación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que ocurre entre los dos a cinco minutos posteriores al reconocimiento, son las primeras y más rápidas respuestas al elicitador. Por la citotoxicidad de los aniones reactivos de oxígeno, se sugiere que esta es la primera línea de defensa de las plantas contra la invasión del patógeno por la eliminación directa y/o la limitación lenta de su ingreso debido al reforzamiento de la pared celular por entrecruzamiento de proteínas estructurales específicas, vía oxidativa. La explosión oxidativa es un proceso finamente regulado por diversas enzimas, entre las que se destacan las NADPH Oxidasas, Superóxido Dismutasas (SOD), Lipoxigenasas, Catalasas, Ascorbato Peroxidasas, Glutathion Transferasas, Peroxidasas y Polifenoloxidasas (Zurbriggen y col. 2010).

Existe un amplio trabajo de búsqueda de nuevas alternativas para el control de las enfermedades a través de la utilización de bioproductos capaces de actuar como elicitores de respuestas defensivas, por lo que este trabajo tiene como objetivo determinar la capacidad antifúngica "*in vitro*" e "*in vivo*" de bioproductos obtenidos a partir de la fermentación de mieles finales.

Materiales y Métodos

Obtención de aislados:

Se obtuvieron aislamientos de bacterias y hongos a partir de mieles finales de las empresas azucareras Carlos Baliño (17) y Antonio Guiteras (21), las cuales presentaban indicios de degradación microbiana. Éstas se diluyeron (15g en 100mL de agua) y se sembraron en medio agar nutriente y agar malta y se incubaron a 37°C y 25°C, respectivamente durante siete días.

Fermentación:

La fermentación se realizó a partir de la miel final 38 de la empresa azucarera Jesús Rabí, la cual no presentaba indicio de degradación microbiana. La miel previamente diluida (15g en 100mL de agua) y esterilizada (121 °C durante 20 min) fue inoculada con los aislados obtenidos anteriormente. Las condiciones de fermentación para los aislados bacterianos fueron: temperatura 37°C y agitación 150 rpm y para los aislados fúngicos: temperatura 25°C y agitación 150 rpm, durante 14 días en ambos casos. La cinética de formación de oligosacáridos se siguió por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), equipo Knauer, columna de Eurokat, Ca 100µL 300 X 8 mm y detector de Índice de Refracción. Las muestras se tomaron cada 24 horas.

Actividad biológica "in vitro":

La actividad antifúngica de los bioproductos se determinó frente al hongo fitopatógeno *Phytophthora nicotianae*. Los bioproductos 21-B y 21-3 se añadieron por separado al medio Agar Papa-Dextrosa, ajustando la concentración de oligosacáridos a 10 µg/ml. Luego se sembró el hongo por punción y se incubó a 28 °C. El diámetro de las colonias se midió a los cinco días de incubación. Como control se tomó el crecimiento del hongo en medio Agar Papa-Dextrosa sin adicionar bioproducto. El análisis de los datos se realizó con el paquete estadístico Statgraf versión 7.0.

Actividad biológica "in vivo":

Se tomaron 30 trozos de una yema de la variedad de caña de azúcar B4362 (altamente susceptible a la Roya) de seis meses de edad y 8 trozos de una yema de la variedad

resistente PR 980, como control de la respuesta defensiva. Se trataron a 50°C durante 20 min y se cultivaron en bandeja con tierra estéril a 25°C y humedad relativa del 60%, durante quince días. Las plantas susceptibles se asperjaron con agua y se aplicaron los bioproductos que habían mostrado actividad antifúngica en el experimento anterior a una concentración de 10µg/ml y se dejaron 24h antes de inocular ambas variedades con el patógeno. La inoculación se realizó aplicando con un pincel fino una solución de esporas de $1,8 \times 10^6$ ufc de *Puccinia melanocephala*, agente causal de la roya, sobre las hojas de las plantas. Se tomaron muestras de las hojas a las 4, 8 y 24 horas post inoculación. Se dejaron como controles sanos 8 plantas no inoculadas de cada variedad y 8 plantas de la variedad susceptible inoculadas con el patógeno y sin previo tratamiento con los bioproductos.

Determinación de respuesta defensiva a través de radicales superóxido:

Las fracciones de hojas se sumergieron en solución fosfato 0,1M pH8,0 conteniendo 35mg de azul de nitrotetrazolio y se les aplicó vacío en una cristalizadora durante 40 segundos, para garantizar la rápida penetración del colorante, que tiene la propiedad de unirse a los radicales superóxido. La reacción histoquímica se visualizó a través de cortes semifinos en microscopio óptico.

Resultados y Discusión

Fermentación:

De la incubación de las mieles finales 17 y 21 se obtuvieron un total de 12 aislados, seis bacterianos y seis fúngicos. Los 12 aislados fueron empleados para la fermentación de la miel 38, pero sólo cinco (17-1, 21-B, 21-3, 21-4 y 21-6) propiciaron un aumento en la concentración de oligosacáridos (Figura 1), un aislado bacteriano (17-1) y cuatro fúngicos (21-B, 21-3, 21-4 y 21-6).

En todos los casos, a partir de las 24h de la fermentación, aumentó la concentración de oligosacáridos. Es de destacar que los productos obtenidos con los aislados 21-3, 21-4 y 21-6 mantienen similares cantidades de oligosacáridos durante los 14 días. Sin embargo, con los aislados 17-1 y 21-B disminuyeron a los nueve y 14 días respectivamente. Resultados similares obtuvo Hormaza (1989) donde demostró el incremento de la concentración de oligosacáridos en las mieles finales debido a la acción de los microorganismos presentes en ellas.

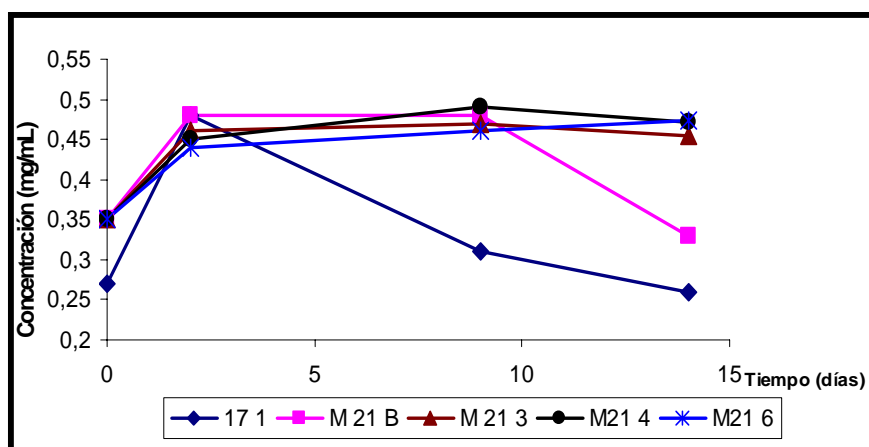


Figura 1. Cinética de obtención de oligosacáridos.

Actividad biológica “in vitro”:

Los productos de la fermentación que contenían oligosacáridos se seleccionaron para realizar la prueba de actividad biológica “in vitro”. Como se observa en la figura 2 sólo dos de los bioproductos aplicados (21-B y 21-3) inhibieron el crecimiento micelial de *P. nicotianae*, lo cual se evidenció en la reducción estadísticamente significativas del diámetro de las colonias formadas con respecto al control y a los otros bioproductos empleados.

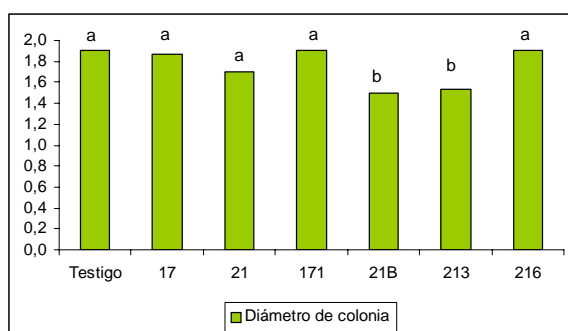


Figura 2. Efecto de los bioproductos sobre el crecimiento “in vitro” de *P. nicotianae*

Actividad biológica “in vivo”:

En la variedad susceptible, a las ocho horas post-inoculación se observó la presencia de radicales superóxidos en las plantas tratadas con los bioproductos 21-B y 21-3, sin embargo no se detectó reacción histoquímica en las plantas controles sanos, ni en las inoculadas sólo con el patógeno (figura 3 a,b,c). En los controles de la variedad resistente inoculadas con *P. melanocephala* se visualizan las zonas de color azul oscuro a las cuatro horas post-inoculación con el hongo; sin embargo, en la susceptible no hay reacción evidente durante las primeras 72h post-inoculación.

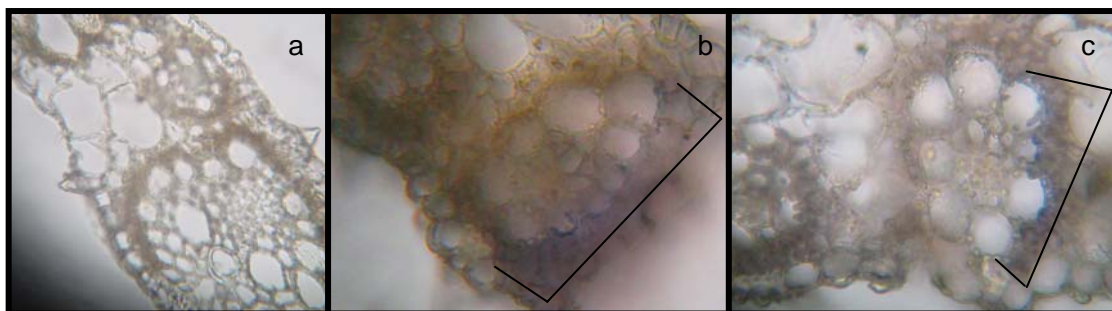


Figura 3. Reacción histoquímica. a) Control inoculado con el patógeno sin previo tratamiento con los bioproductos (8h), b) Planta tratada con el bioproducto 21-B (8h). c) Planta tratada con el bioproducto 21-3 (8h)

La explosión oxidativa constituye una de las más rápidas respuestas inducidas frente a la presencia de un patógeno, es la primera vez que se utiliza en tejidos de caña de azúcar, la detección de radicales superóxido a través de la reacción de color con el azul de nitro tetrazolio.

Consideraciones finales

En este trabajo no se realiza un análisis genómico de las alteraciones en la expresión de genes que se activan durante las horas iniciales de la interacción, pero sí se obtuvieron las primeras evidencias “*in situ*” de la actividad elicitora de los bioproductos obtenidos a partir de la fermentación de mieles finales. Lo que reviste gran importancia, teniendo en cuenta que estas mieles son subproductos de las empresas azucareras, que pueden llegar a jugar un papel importante en la lucha contra las enfermedades.

Referencias

- Chakravarthy, S; Velásquez, AC; Martin, GB. Assay for pathogen-associated molecular pattern (PAMP)-triggered immunity (PTI) in plants. *J. Vis. Exp.* 9(31). doi: 10.3791/1442. 2009.
- Galletti, R; Denoux, C; Gambetta, S; Dewdney, J; Ausubel FM; De Lorenzo G; Ferrari S. The AtrbohD-Mediated Oxidative Burst Elicited by Oligogalacturonides in Arabidopsis is Dispensable for the activation of Defense Responses Effective against *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology*. 148:1695-1706. 2008.
- Godfrey, D; Zhang, Z; Saalbach, G; Thordal-Christensen, H. A proteomics study of barley powdery mildew haustoria. *Proteomics*. 9(12):3222-3232. 2009.
- Hormaza, J.V.; Lines, G.; López, M.; Ramos, E. Oligosaccharides and sucrose crystal habit. Proc 20th Congress ISSCT, 79. 1989.
- Orsomando G, Lorenzi M, Raffaelli N., Dalla R. M., Mezzetti B, and Ruggieri S. hytotoxic Protein PcF, Purification, Characterization, and cDNA Sequencing of a Novel Hydroxyproline-containing Factor Secreted by the Strawberry Pathogen *Phytophthora cactorum*. *J. Biol. Chem.* 276 (24): 21578-21584. 2001.
- Rietz S.; Parker J.E.; Plant disease and defence. *Encyclopedia of life science*. Ltd. www.els. Net. 2007.
- Staskawics, B.J., Genetics of plant-pathogen interactions specifying in plant disease resistance. *Plant Physiology*, 125: 73-76. 2001.
- Torres, MA. ROS in biotic interactions. *Physiol. Plant.* 138(4):414-429. 2010.
- Walley, JW; Dehesh, K. Molecular mechanisms regulating rapid stress signaling networks in Arabidopsis. *J. Integr. Plant. Biol.* 52(4):354-359. 2010.
- Yamaguchi T, Ita Y, Shibuya N. Oligosaccharide elicitors and their receptors for plant response. *Trends in Glycoscience & Glycotechnology*. 12. (64): 113-120. 2000
- Zurbriggen, MD; Carrillo, N; Hajirezaei, MR. ROS signaling in the hypersensitive response: When, where and what for? *Plant. Signal Behav.* 26:5(4). [Epub ahead of print]. 2010.