

Inhibición de la biosíntesis de poliaminas como estrategia de control de las enfermedades causadas por ascosporas de *Sclerotinia Sclerotiorum*

Gárriz A., Dalmasso M.C., Marina M., Rivas E., Ruiz O.A. y Pieckenstein F.L.
Instituto de Investigaciones Biotecnológicas- Instituto Tecnológico de Chascomús (IIB-INTECh)-UB1

Introducción y Objetivos

Las poliaminas son compuestos policatiónicos presentes en todos los seres vivos (1). Se ha descrito su importancia en muchos procesos biológicos y que de bido a su carga neta positiva a pH fisiológico se unen a macromoléculas carga das negativamente como ADN, ARN y fosfolípidos. En plantas, su biosíntesis comienza con la descarboxilación del aminoácido ornitina por la enzima ornitina descarboxilasa (ODC), formando putrescina (Put). Alternativamente, la arginina es descarboxilada por la arginina descarboxilasa (ADC) para formar agmatina, la cual es luego transformada en Put (Fig. 1).



Posteriormente, dos grupos aminopropilo son adicionados sucesivamente a la Put por la espermidina sintasa (Espd sint) y la espermina sintasa (Espm sint), produciendo espermidina (Espd) y espermina (Espm) respectivamente. Los grupos aminopropilo provienen de la S-adenosilmetionina descarboxilada, la cual es producida por la S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMdc). La mayoría de los hongos estudiados hasta el presente carecen de actividad ADC, y por lo tanto sólo sintetizan poliaminas vía ODC. Así, se ha propuesto que frente al ataque de un hongo fitopatógeno, la inhibición de esta enzima bloquearía la síntesis de poliaminas solo en éste, ya que la planta mantendría activa aún la vía de la ADC. Esto evitaría el crecimiento fúngico y por lo tanto, el desarrollo de la enfermedad (2).

El objetivo de este trabajo fue estudiar el metabolismo de poliaminas durante la germinación de ascosporas de *Sclerotinia sclerotiorum*, uno de los principales patógenos del girasol cultivado en nuestro país. Además, se evaluó la capacidad de diferentes inhibidores de la biosíntesis de poliaminas de disminuir los daños provocados por infecciones causadas por ascosporas de este hongo sobre discos de hojas de tabaco y sobre capítulos de girasol.

Materiales y Métodos

Material biológico y reactivos utilizados

Se utilizó el girasol híbrido (*Heliantus annuus*) P.221 de Palaversich y Cia. S.A.C. (Barenbrug), plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) Wisconsin W38, y la cepa de *S. sclerotiorum* IFCC 458/02 de la colección de hongos del IIB-INTECh. Los inhibidores de la biosíntesis de poliaminas usados fueron: α-difluoro-metil-ornitina (DFMO), inhibidor específico de la ODC; ciclohexilamina (CHA), inhibidor de la Espd sintasa; y Metil-glioxal-bis-guanilhidrazona (MGBG), el cual inhibe a la SAMdc.

Determinación del efecto de los inhibidores de la biosíntesis de poliaminas sobre la germinación de ascosporas de *S. sclerotiorum* y los niveles de poliaminas

Se inocularon placas 'multiwell' con ascosporas de *S. sclerotiorum* (3000 ascosporas/pocillo) en medio de cultivo Czapek-Dox líquido (Vl= 40 ml) con distintas concentraciones de DFMO, CHA y MGBG. Las placas se incubaron 18 h a 25 °C y luego se determinó el porcentaje de germinación de las ascosporas por observación al MO, contando aproximadamente 100 ascosporas por pocillo. Para la determinación de poliaminas, cajas de Petri con 6 ml de medio de cultivo Czapek-Dox líquido fueron suplementadas con DFMO o CHA (ambos en conc. final= 10 mM) o bien con MGBG (conc. final= 0.25 mM). Luego se inocularon las placas con ascosporas (1x10⁶ ascosporas/ placa) y se incubaron 18 h a 25 °C. Las ascosporas fueron cosechadas, pesadas y luego maceradas en 200 mL de ácido perclórico al 5%. Las poliaminas presentes en el extracto fueron derivatizadas con cloruro de dansilo y su concentración se determinó por HPLC (3). De la misma manera se procesaron muestras de 1x10⁶ ascosporas sin germinar, con el fin de determinar los niveles de poliaminas antes de la germinación.

Efecto de los inhibidores de la biosíntesis de poliaminas sobre la infección de discos de hojas de tabaco y capítulos de girasol por ascosporas de *S. sclerotiorum*

Discos de hojas de tabaco de 18 mm de diámetro se sumergieron durante 30 segundos en una solución de inhibidor (10 mM de DFMO o CHA y 5 mM para MGBG) o agua (controles). Los discos se colocaron en placas de Petri con 0,8% Agar-Agua y se inocularon colocando en el centro 20 ml de una suspensión de 150 ascosporas/ml. Se incubaron las placas a 25 °C y aproximadamente a las 72h se determinó el número de discos infectados y el área de la lesión utilizando el software Image-Pro versión 4.1.

Por otro lado, capítulos de plantas de girasol (25 por tratamiento) en estado R5-R6 fueron inoculados pulverizando 3,5 ml de una solución de 3000 ascosporas/ml. Para los tratamientos con inhibidores, la solución de ascosporas se suplementó con MGBG (5 mM), DFMO o CHA (10 mM ambos). Los capítulos se cubrieron con bolsas de plástico y se determinó el período de aparición de los síntomas, la evolución de los mismos, y el número de capítulos infectados.

Análisis Estadístico

En el estudio del efecto de los inhibidores sobre la germinación y los niveles de poliaminas en ascosporas, todos los tratamientos consistieron de al menos 3 repeticiones y cada ensayo se realizó 2 veces. Los resultados se analizaron con el test de Bonferroni. Los resultados de las infecciones de discos de hojas de tabaco y de capítulos de girasol se analizaron con el test de la C2, la comparación del tamaño de la lesión en los primeros se realizó con el test de Bonferroni.

Resultados y Discusión

La MGBG disminuyó drásticamente la germinación de ascosporas de *Sclerotinia sclerotiorum* en forma dosis dependiente (Tabla 1). Por su parte, la DFMO provocó una disminución del 22% a la mayor concentración utilizada (10 mM), y no se observó ninguna alteración en los tratamientos con CHA. La comparación de estos resultados con los obtenidos anteriormente al estudiar el efecto de los inhibidores sobre el crecimiento de micelio (4), demuestra que la germinación de ascoporas es relativamente insensible a la acción de dichos compuestos. Esto podría deberse a: 1) una baja incorporación de los inhibidores por las ascoporas, 2) que las enzimas de la síntesis de poliaminas en ascoporas sean menos sensibles a los inhibidores que las presentes en micelio, 3) la presencia de niveles de poliaminas en ascoporas suficientes para soportar la germinación aun cuando la síntesis de poliaminas se encuentre inhibida.

Con el fin de entender las bases de la relativa resistencia de las ascoporas a los inhibidores, se determinaron los niveles de poliaminas durante su germinación (Tabla 2). Todos los inhibidores causaron una disminución equivalente en los niveles de Espd, aunque sus efectos sobre las otras poliaminas fueron variables. Así, los niveles de Put aumentaron un 40% en presencia de MGBG, pero no fueron alterados por la DFMO (en las condiciones experimentales empleadas, no se pueden determinar los niveles de Put en presencia de CHA). El único inhibidor que alteró los niveles de Espm fue la DFMO, provocando un aumento de 2.7 veces en los niveles de dicha tetraamina. Estos resultados evidencian la incorporación de los inhibidores a las esporas y su acción sobre las enzimas blanco. En el caso específico de la DFMO, su acción sobre la ODC se comprobó además al determinar la actividad de esta enzima (datos no presentados). Por otro lado, los niveles de las tres poliaminas descendieron notablemente durante la germinación de las ascoporas (Tabla 2), sugiriendo que los niveles iniciales de poliaminas en las ascoporas son suficientes para permitir el progreso de la germinación.

La MGBG y la CHA disminuyeron significativamente el tamaño de las lesiones desarrolladas sobre discos de hojas de tabaco inoculados con ascoporas, mientras que la DFMO no ejerció ningún efecto (Tabla 3). La MGBG también disminuyó el número de discos infectados, mientras que el efecto de la CHA sobre este parámetro mostró una gran variabilidad entre experimentos. La aplicación de DFMO no redujo el número de discos infectados. En forma semejante a lo observado con discos de hoja de tabaco, solo la MGBG redujo la incidencia de la podredumbre blanda del capítulo del girasol (Tabla 4). Ninguno de los inhibidores empleados redujo el período de latencia de las infecciones ni la evolución de los síntomas.

Tabla 1. Efecto de los inhibidores de la biosíntesis de poliaminas sobre la germinación de ascosporas de *S. sclerotiorum*.

[inhibidor] (mM)	DFMO	CHA	MGBG
0.00	90	90	90
0.10	ne	ne	90
0.25	ne	ne	88
1.00	90	90	48***
5.00	84	90	5***
10.00	68*	89	0***

* Los datos se compararon mediante el test de Bonferroni donde *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ne= no evaluado.

Tabla 2. Poliaminas libres en esporas de *S. sclerotiorum*

Concentración de poliaminas (nmol g FW-1)				
Tratamiento	PUT	SPD	SPM	
Control sigeminar	1810***	7706***	295***	
Control	148	632	17	
DFMO 10 mM	105	348*	46*	
CHA 10 mM	nd	258**	12	
MGBG 0.25 mM	209*	402*	18	

Los resultados se compararon mediante el test de Bonferroni, donde *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Tabla 3. Efecto de los inhibidores de la biosíntesis de poliaminas sobre el tamaño de la lesión causada por ascosporas de *S. sclerotiorum* en discos de hojas de tabaco.

Tratamiento	Área de la lesión (mm ²)
Control	27.5±5.0
DFMO 10 mM	25.0±5.0
CHA 10 mM	15.0±2.0**
MGBG 5 mM	12.5±2.0**

* Los resultados se compararon mediante el test de Bonferroni donde *p<0.05, **p<0.01.

Tabla 4. Determinación del efecto de los inhibidores de la biosíntesis de poliaminas sobre la incidencia de la podredumbre blanda de capítulos de girasol causada por ascosporas de *S. sclerotiorum*

Tratamiento	Plantas infectadas	Plantas no infectadas
Control	21	3
DFMO 10 mM	24	2
CHA 10 mM	23	3
MGBG 5 mM	13*	10*

Los resultados se analizaron mediante el test de la C2, donde *p<0.05.

Conclusiones

● Los tres compuestos ensayados en este trabajo son incorporados por las ascoporas de *S. sclerotiorum*, y alteran los niveles de poliaminas en las mismas.

● Contrariamente a lo esperado, la inhibición de la ODC no afectó la germinación de las ascoporas ni el desarrollo de la enfermedad en discos de hojas de tabaco y plantas de girasol. Estos efectos sí fueron observados al inhibir la SAMdc.

● Probablemente, las concentraciones iniciales de poliaminas en esporas son suficientes para permitir su germinación aun cuando algunas de las enzimas involucradas en su síntesis se encuentren inhibidas.

● El MGBG sería el inhibidor de la biosíntesis de poliaminas con mayor potencial para el control de enfermedades causadas por ascoporas de *S. sclerotiorum*. Dado que este inhibidor podría actuar también sobre el metabolismo de poliaminas de la planta huésped, nuestros próximos trabajos estarán dirigidos al estudio del efecto del mismo sobre el rendimiento y la calidad de semillas de girasol.

Referencias

- 1-Tabor CW y H Tabor (1984). Annu Rev Biochem 53:749-790.
- 2-Walters DR y CA McIntosh (1997). Physiologia Plantarum 100:689-695.
- 3-Marcé, M., D.S. Brown, T. Capell, X. Figueras y A.F. Tiburcio (1995). Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications 666:329-335.
- 4-Pieckenstein F.L., Gárriz A., Chormozaz E., Sánchez D and Ruiz OA- Antonie van Leeuwenhoek Int J Gen & Mol Microbiol 80:245-253 (2001).