

# INCREMENTO DE LA CAPACIDAD INVASIVA DE *ASPERGILLUS FLAVUS* Y *A. PARASITICUS* EN SEMILLAS DE MANÍ POR ACCIÓN DE PROTEASAS EXTRACELULARES

R. Asis, S. Araujo, D. Barrionuevo y M. Aldao.

Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, UNC.

Las plantas disponen de una barrera de defensa que cubre las partes expuestas. En ella, participan tres tipos principales de sustancias: cutina, pectina y ceras. También se pueden considerar dentro de esta defensa, las membranas de las células vegetales con sus polisacáridos, lípidos y proteínas. El grado de virulencia de los microorganismos patógenos suele relacionarse con la expresión de enzimas que degraden las barreras de defensa del huésped. *A. flavus* y *A. parasiticus* son hongos productores de aflatoxinas que en determinadas condiciones de campo colonizan las semillas de la planta de maní. La colonización de *Aspergillus* en semillas de maní se ha observado que se producen posteriormente a la ocurrencia de lesiones en la vaina y tegumento o cuando las plantas son expuestas a un período de sequía. Es por ello que algunos autores han considerado a estos hongos como patógenos débiles u oportunistas. Sin embargo otros han señalado que *Aspergillus* presenta capacidad de colonizar semillas sin lesiones o estrés hídrico. En estudios previos, en este laboratorio se comprobó la acción de enzimas hidrolíticas, que habían sido descritas relacionadas a la virulencia de *A. flavus* en la infección de semillas de algodón, en la colonización de maní. En ese estudio se pudo observar que las enzimas cutinasas y proteasas favorecerían la colonización. El objetivo del presente estudio fue demostrar que las proteasas de *A. flavus* y *A. parasiticus* incrementan la capacidad invasiva de estos hongos en semillas de maní.

## Materiales y Métodos

Se utilizaron dos genotipos del banco de germoplasma de la E.E.INTA Manfredi: a) PI337394, caracterizado como resistente y b) Florman, caracterizado como susceptible a la infección de *A. flavus* y *A. parasiticus*.

Como cepas de hongos infectantes, se utilizaron dos aislamientos: el aislamiento 6 (*A. flavus*) y el aislamiento 18 (*A. Parasiticus*), ambos fueron aislados en semillas de maní en el área de producción de la provincia de Córdoba. Además, se utilizó una cepa de referencia *A. Parasiticus* NRRL 2999, altamente productora de aflatoxinas.

## Evaluación de la capacidad invasiva de *Aspergillus* posterior a la inducción de síntesis de proteasas en medios de cultivo.

La cepa y aislamientos fueron desarrollados durante 10 días a 30°C en medios de cultivos que contenían: A) caseína como única fuente de carbono y B) agar papa dextrosa como medio de referencia.

Finalizada la incubación, semillas de los dos genotipos en estudio, desinfectadas con hipoclorito 0.5% fueron colocadas sobre el micelio de cada cultivo (5 semillas de cada genotipo por placa). Las placas fueron nuevamente incubadas en las mismas condiciones durante 3 días.

La colonización de las semillas fue evaluada por inspección visual utilizando un ranking de colonización de 1-5 (1<20, 5>80% de la superficie de la semilla cubierta con micelio esporulado). Cada semilla de cada genotipo fue evaluada individualmente, promediada y comparado con el promedio de cada genotipo en el cultivo de referencia para cada cepa.

## Comprobación de los efectos de las proteasas extracelulares sobre la colonización de maní y contaminación con aflatoxinas.

El aislamiento 18 (*A. parasiticus*) fue cultivado en medio líquido con caseína durante 10 días a 30°C. Las proteasas extracelulares sintetizadas en el medio de cultivo fueron aisladas en el sobrenadante y precipitadas con acetona 70%. La actividad de proteolítica del precipitado fue analizada con placa de agar caseína donde fue sembrada una alícuota e incubada toda la noche. La proteólisis fue revelada con ácido tricloroacético 20% mostrando actividad enzimática en zona sin turbidez. Las semillas del genotipo resistente fueron desinfectadas y 10 gramos fueron incubados con una solución de proteasas en buffer fosfato pH 8 estéril. Como control se incubaron 10 gramos de semillas con buffer fosfato estéril. La incubación fue realizada por un periodo de 20 horas a 30°C. Posteriormente las semillas fueron lavadas con agua destilada estéril, infectadas con una suspensión de esporo ( $10^5$  esporos / ml) de *A. parasiticus* e incubadas durante 5 días.

La colonización de las semillas se determinó por la cuantificación de Ergosterol (marcador químico de masa fúngica) por HPLC y las aflatoxinas fueron valoradas por HPLC previa purificación por columnas de inmunoafinidad Vicam.

### Resultados

La colonización de los genotipos resistente y susceptible por *Aspergillus* se presenta en la figura 1. En la figura 1A al igual que 1B se observa una mayor colonización en ambos genotipos por la cepa y aislamientos desarrolladas en cultivos de caseína. Así mismo es posible observar las diferentes susceptibilidades a la infección por ambos genotipos.

Los efectos de las proteasas extracelulares de *Aspergillus* sobre la infección del genotipo

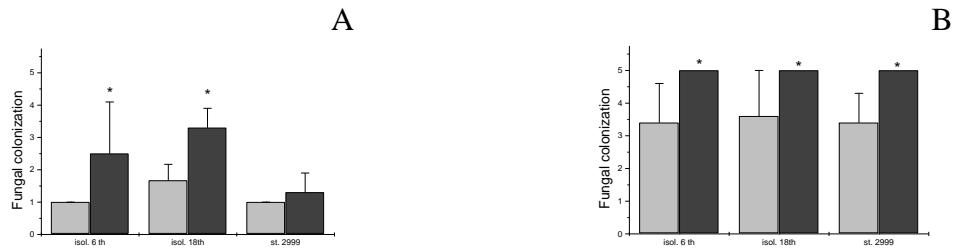


Fig. 1- Colonización de la cepa NRRL 2999 y aislamientos 6 y 18 previamente desarrollados en caseína agar ■ y agar papa dextrosa □ sobre el genotipo PI337394 (A) y Florman (B). \* indican diferencias significativas (P<0.05).

resistente se presentan en la figura 2 A. Las semillas tratadas con las proteasas extracelulares de *Aspergillus* fueron más susceptibles a la infección y a la contaminación de aflatoxinas (figura2 B).

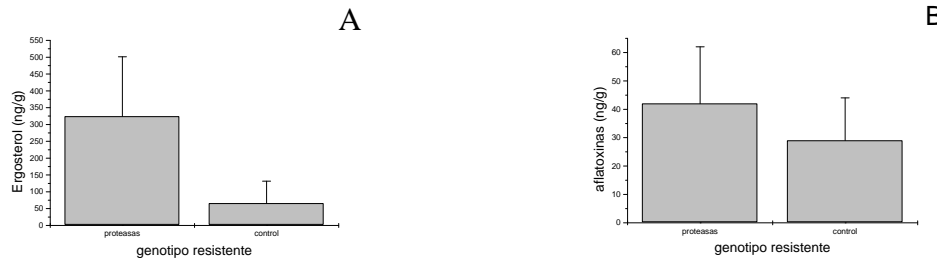


Fig. 2- (A) Colonización de las semillas del genotipo resistente tratado con proteasas extracelulares de *Aspergillus* y sin tratamiento (control). (B) Contaminación de aflatoxinas.

### Conclusiones

En este estudio se propuso demostrar a las proteasas como factores de virulencia en la infección de maní por *A. flavus* y *A. parasiticus*. El desarrollo de *Aspergillus* en medios con caseína predispone a los hongos a una mayor colonización sobre las semillas de maní que cuando se desarrollaron sobre agar-papa dextrosa. De igual manera, la actividad de las proteasas extracelulares de *Aspergillus* sobre las semillas de maní incrementaron la susceptibilidad a la infección y contaminación de aflatoxinas en el genotipo resistente. Estos resultados demuestran una participación de las proteasas extracelulares en la infección de maní, favoreciendo la capacidad invasiva de *Aspergillus*.