

# IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS ANTIFÚNGICAS ASOCIADAS CON LA RESISTENCIA A LA INFECCIÓN DE HONGOS PRODUCTORES DE AFLATOXINAS

Muller, Virginia<sup>1</sup>; Gieco, Jorge<sup>2</sup>; Asis Ramon

1-Departamento de Bioquímica Clínica-CIBICI, Facultad de Ciencias Químicas, UNC

2- Laboratorio de Biotecnología, INTA EEA Manfredi

rasis@fcq.unc.edu.ar

## Introducción

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios sintetizados por hongos del género *Aspergillus*, especies *flavus* y *parasiticus* casi exclusivamente. Estas sustancias tóxicas han sido identificadas como hepatotóxicas y cancerígenas (Groopman 1988).

El hongo crece sobre varios alimentos, cuando las condiciones de sustrato y condiciones del entorno le son favorables, uno de los cultivos afectados es maní, pudiendo ocasionar pérdidas importantes en las cosechas. La contaminación de aflatoxinas en campo se ve influenciada significativamente por las condiciones ambientales. El estrés hídrico es la variable que promueve la mayor contaminación de los cultivos en la precosecha (Holbrock 2000) y dado que el núcleo de producción de maní en Argentina se encuentra situado en la región semiárida central, donde a menudo períodos de precipitaciones adecuadas son seguidas por períodos de sequía (Collino 2000). El estudio para encontrar genotipos resistentes a la contaminación de aflatoxinas, resulta de vital importancia para abordar una solución al problema. Independientemente de la influencia climática existen diferencias de la susceptibilidad al enmohecimiento y producción de aflatoxinas entre distintos genotipos de maní (Holbrock 2000, Asis 2005). La búsqueda de genotipos resistentes a la infección por *A. flavus* y *A. parasiticus* es una de las estrategias para prevenir la contaminación de las cosechas.

La identificación de genes asociados con la resistencia de maní a la infección fúngica y contaminación de aflatoxinas es fundamental para obtener genotipos resistentes ya sea a través del mejoramiento asistido por marcadores moleculares o por la ingeniería genética. En trabajos previos realizados por nuestro grupo encontramos que la resistencia a la contaminación con aflatoxina se encuentra asociada con una resistencia a la infección fúngica (Asis 2005, 2009). En este trabajo nos propusimos identificar proteínas antifúngicas que participan en la respuesta de defensa a la infección con *Aspergillus parasiticus*.

## Materiales y Métodos

Para este estudio se emplearon semillas del genotipo Florman y PI337394 caracterizados como susceptible y resistente a la infección respectivamente. Las proteínas fueron extraídas con un equipo ultraturax. La separación de las mismas se realizó en un cromatógrafo FPLC Akta. Las electroforesis bidimensionales se realizaron con un equipo de isoelectroenfocado Ethan IPGphor 3. Las proteínas fueron identificadas con un equipo HPLC acoplado a un espectrómetro de masas (MALDI-tof Brukers).

## Resultados

En estudios previos realizados en este grupo se caracterizó la resistencia a la contaminación con aflatoxinas en seis genotipos de maní (Asis y col, 2005). La resistencia encontrada en algunos genotipos estuvo asociada a la integridad del tegumento. Sin embargo uno de ellos, el genotipo PI 337394 presentó parcial resistencia a la contaminación y al enmohecimiento en los cotiledones. En el desarrollo de este estudio, se procedió a identificar en este genotipo proteínas con actividad antifúngica. Para ello las semillas del genotipo Florman y PI337394 fueron desinfectadas e infectadas con *Aspergillus parasiticus* e incubadas durante 48 hs en condiciones favorables a la infección, donde fue posible evidenciar una diferencia significativa de la infección entre los genotipos (Figura 1A). Las proteínas del genotipo resistente fueron extraídas de las semillas desgrasadas y separadas por cromatografía de intercambio iónico y filtración molecular (Figura 1B).

En las fracciones obtenidas se evaluó la actividad antifúngica en cultivos líquidos inoculados con *Aspergillus parasiticus* y suplementados con estas fracciones. Como control se utilizaron cultivos suplementados con buffer Tris-HCl 20mM pH 8.9. La inhibición del crecimiento fue analizada por inspección microscópica (Figura 1C) y por medición de la absorbancia a 600 nm, siendo comparadas con el control.

Las proteínas de fracciones con actividad antifúngicas fueron separadas por electroforesis unidimensional y bidimensional (Figura 1D). La electroforesis bidimensional permitió separar proteínas que no se separaron con el sistema unidimensional. Las bandas proteicas fueron aisladas del gel de acrilamida cortando tacos para el análisis de identificación de proteínas. Las proteínas presentes en estos tacos fueron extraídas, tratadas con tripsina y separados por HPLC/MALDI-TOF. Los espectros de masa obtenidos fueron analizados contra una librería de proteínas y cDNA para identificar la proteína (Figura 1E).

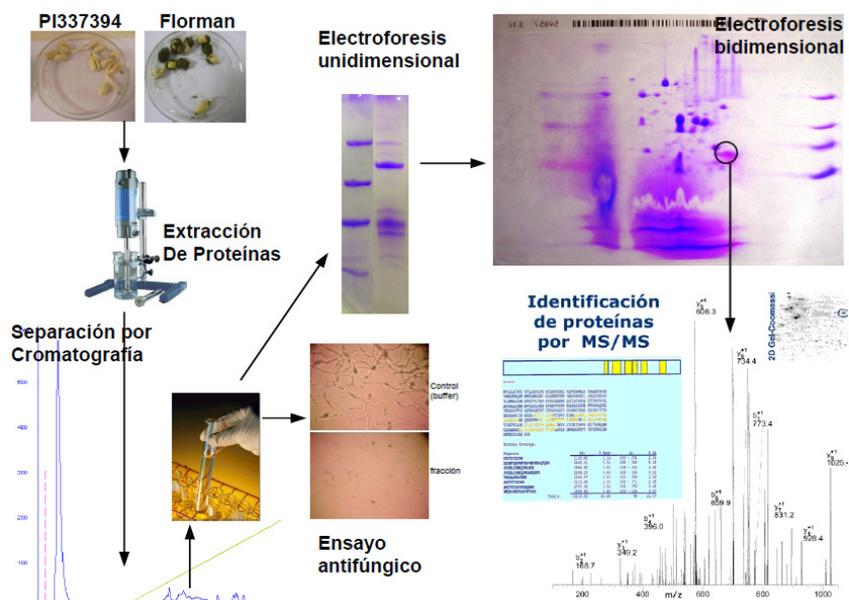


Figura 1- Marcha analítica para la separación e identificación de proteínas antifúngicas en semillas de maní.

En este estudio se han identificado: a) proteínas con conocida actividad antifúngica como quitinasas y proteínas relacionada a patogénesis, b) proteínas que participan en la respuesta de defensa como superóxido dismutasas, lectinas y alergenos.

Con el objetivo de encontrar asociaciones entre la composición y producción de estas proteínas y la resistencia a la infección. Se realizó la marcha analítica para aislar las proteínas descritas y comparar su composición entre el genotipo susceptible y resistente. Los resultados de la electroforesis bidimensional muestra importantes diferencias en tanto a la composición como producción de estas proteínas entre los genotipos (Figura 2). Actualmente se está confirmando la identificación de las mismas.

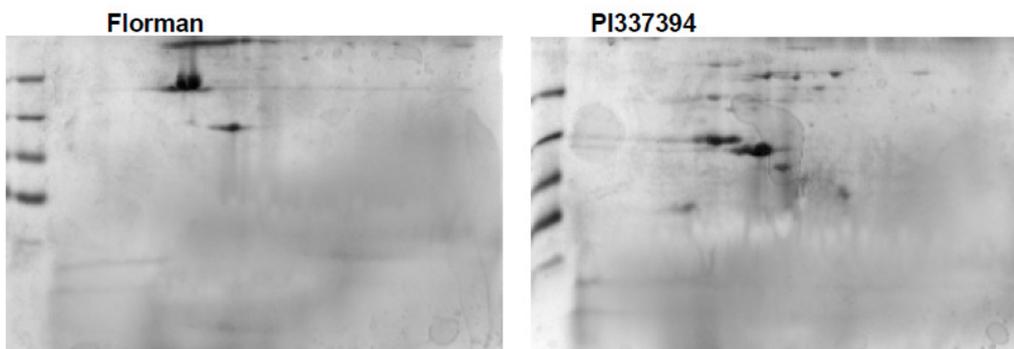


Figura 2- Comparación de la composición y producción de proteínas antifúngicas entre el genotipo Florman (susceptible a la infección) y el genotipo PI337394 (resistente a la infección).

Estos resultados evidencian la participación de proteínas con una conocida actividad antifúngica y proteínas de defensa en la resistencia a la infección de *Aspergillus parasiticus* sobre el genotipo resistente.

-Asis, R., Barrionuevo D. L., Giorda L. M., Nores L. M., and Aldao M. A. (2005). Aflatoxin Production in Six Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Genotypes Infected with *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*, Isolated from Peanut Production Areas of Cordoba, Argentina. *J Agric Food Chem* 53 (23): 9274-9280.

-Asis R., Muller V., Barrionuevo D. L., Araujo S. A and Aldao M. (2009). Analysis of protease activity in *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* on peanut seed infection and aflatoxin contamination. *European Journal Plant Pathology*. 124:391-403.

-Collino D.J., Dardanelli J.L., Sereno R., Racca R.W. (2000) Physiological responses of argentine peanut varieties to water stress. *Water uptake and water use efficiency. Field Crops Research* 68: 133-142

-Holbrook, C. C. K., C.K.; Rucker, D.M.; Wilson, J.E.; Hook, J.E. and Matheron, M.E. (2000). Preharvest Aflatoxin Contamination in Drought-Tolerant and Drought-Intolerant Peanut Genotypes. *Peanut Sci* 27:45-48.

-Groopman, J. D.; Cain, L. G. and Kensler, T. W. (1988). Aflatoxin exposure in human populations: measurements and relationship to cancer. *Crit Rev Toxicol* 19 (2):113-45.