

CONTROL BIOLÓGICO DE ASPERGILLUS SECCIÓN FLAVI Y REDUCCIÓN DE LA CONTAMINACIÓN CON AFLATOXINAS EN MANÍ

Alaniz Zanon, M.S. y Chulze, S.N
Dto. Microbiología e Inmunología. Fac. Cs. Exactas, Fco-Qcas y Naturales-UNRC
malaniz@exa.unrc.edu.ar

Introducción

El cultivo de maní (*Arachis hypogaea* L.) puede contaminarse con especies de *Aspergillus* de la sección Flavi, predominantemente *A. flavus* y *A. parasiticus*, las cuales pueden, en condiciones favorables, producir aflatoxinas. Los cuatro tipos de aflatoxinas más importantes que se pueden detectar como contaminantes naturales son: AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂, siendo el tipo B₁ el que se detecta con mayor frecuencia y en niveles más altos. Otros cultivos susceptibles de contaminación con estas micotoxinas son maíz, girasol, entre otros.

Algunas cepas de *A. flavus* pueden sintetizar ácido ciclopiazónico (ACP), otro metabolito secundario tóxico.

Las cepas de *A. flavus* se dividen en dos morfotipos de acuerdo al tamaño y a la cantidad de esclerocios (estructuras de resistencia) producidos. Las cepas L producen pocos esclerocios con tamaños mayores a 400 µm, mientras que las cepas S producen numerosos esclerocios menores a 400 µm. El segundo tipo está mayormente asociado a la producción de aflatoxinas.

Uno de los sistemas de reconocimiento que median el flujo génico en las poblaciones de *Aspergillus* es la compatibilidad sexual, que está determinada por un locus de tipo de apareamiento (mating-type, MAT), designado MAT1-1 o MAT1-2. En las cepas que poseen diferentes tipos de apareamiento, los loci ocupan la misma posición en el cromosoma, aunque poseen diferente secuencia en el ADN (idiomorfos).

Para el control de la contaminación con aflatoxinas en maní se utilizan diferentes estrategias a nivel de las diferentes etapas del proceso de producción. Cepas atoxicogénicas se pueden aislar del ecosistema maní y pueden ser utilizadas a nivel de campo como un bioformulado basado en la metodología de exclusión competitiva. El objetivo del presente trabajo fue seleccionar cepas de *A. flavus* no aflatoxicogénicas para ser utilizadas en ensayos de control biológico y en la formulación de agentes de biocontrol aplicados a maní y otros cultivos de interés regional.

Materiales y Métodos

Un pool de cepas de *A. flavus* aisladas de suelo, granos de maní e insectos fueron evaluadas en relación a su capacidad aflatoxicogénica mediante cromatografía en capa delgada (TLC). La presencia/ausencia de aflatoxinas se determinó mediante observación bajo luz UV (360 nm). La confirmación de la atoxicogenicidad se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Las cepas atoxicogénicas fueron analizadas en cuanto a la producción de ACP utilizando la técnica de TLC.

Se determinó además el morfotipo de cada una de las cepas en estudio en relación a la producción de esclerocios en dos medios de cultivo: agar Czapek Dox y agar V8. Los cultivos se incubaron a 30°C en oscuridad.

Las cepas de *A. flavus* no aflatoxicogénicas en análisis también se caracterizaron según el locus MAT, obteniendo el ADN de cada una de ellas mediante una extracción con buffer CTAB y 2-mercaptoetanol, y llevando a cabo una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), donde se amplificaron fragmentos de 390 pb o 270 pb, según correspondiera a MAT1-1 o MAT1-2, respectivamente. Los fragmentos fueron separados por electroforesis en geles de agarosa.

Por último, se realizaron ensayos de competencia en maní en caja y en granos de maíz, debido a su potencial aplicación futura como agente de biocontrol para ambos cultivos. Se realizaron ensayos de competencia in situ. Para este ensayo se pre-seleccionaron 6 cepas de *A. flavus* no aflatoxicogénicas y 1 cepa control altamente productora de aflatoxinas. Luego de la incubación se llevó a cabo la extracción y cuantificación de las aflatoxinas.

Resultados y Discusión

A partir del pool de cepas de *A. flavus* evaluadas, 102 cepas fueron no aflatoxicogénicas según TLC y sólo 50 de ellas fueron no-aflatoxicogénicas por HPLC (límite de detección= 20 µg/kg).

De estas 50 cepas, 13 no produjeron ACP. Así, se corrobora lo expuesto en otros trabajos respecto a que la producción de ACP no tiene correlación alguna con la formación de aflatoxinas, aunque los clusters de genes involucrados con la biosíntesis de ambas toxinas se ubican adyacentes.

El 70% de las cepas mostró morfotipo L, mientras que sólo el 6% produjo esclerocios pequeños (<400 µm de diámetro) y en gran cantidad, correspondientes al morfotipo S. El 24% restante no formó estructuras de resistencia. En general, las cepas de *A. flavus* de morfotipo S son productoras de aflatoxinas y en altas concentraciones, mientras que las L producen menor cantidad de esclerocios y niveles bajos o nulos de aflatoxinas (Figura 1).

Un 78% de las cepas (39) presentaron el tipo de apareamiento MAT1-1. Este resultado sugiere una baja probabilidad de ocurrencia de reproducción sexual entre los individuos de la población de cepas de *A. flavus*, ya que ésta solamente podría concretarse en poblaciones con similares proporciones de MAT1-1 o MAT1-2 debido a la segregación independiente de los genes de tipo de apareamiento (mating-type).

Las 6 cepas evaluadas en los ensayos de competencia fueron capaces de generar un desplazamiento de la cepa productora de aflatoxinas (AF13), observando una disminución en la concentración de aflatoxinas en ambos sustratos. En maní, las cepas AF100G y AFCHG2 fueron las más efectivas, con porcentajes de reducción entre 90-100%. En maíz, las cepas AFCHG2 y GD070 arrojaron los mejores resultados en la reducción de la contaminación con aflatoxinas, con valores entre 94-78% de reducción (Figura 2). A partir de estos resultados se demuestra que la capacidad competitiva y la habilidad para prevenir la contaminación de los granos con aflatoxinas son características de cada cepa. En la etapa de selección de cepas potencialmente biocontroladoras es importante evaluar dicha capacidad en el cultivo de interés.

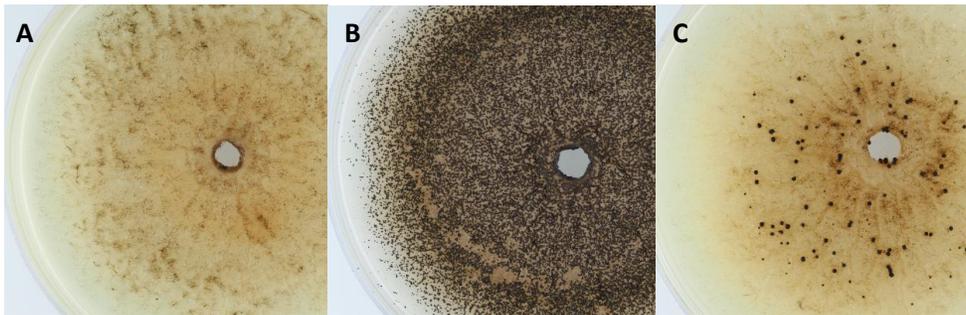


Fig. 1. Placas con agar Cz. **A:** cepa no productora de esclerocios. **B:** cepa S. **C:** cepa L.

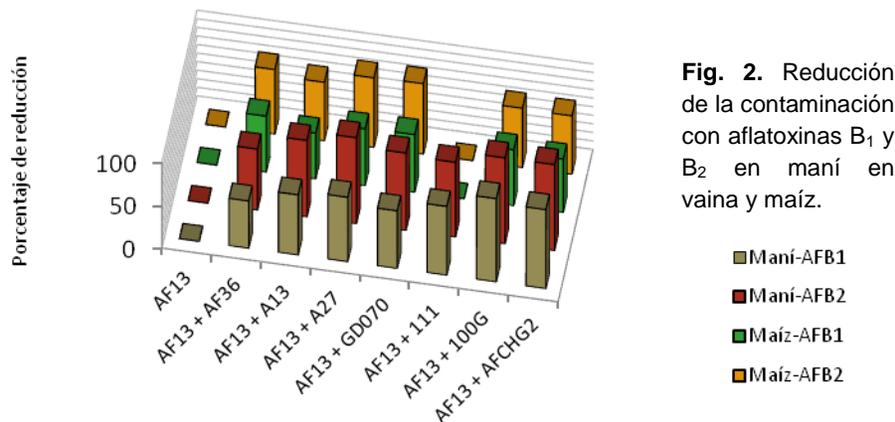


Fig. 2. Reducción de la contaminación con aflatoxinas B₁ y B₂ en maní en vaina y maíz.

Conclusiones

- Se seleccionó un grupo de 7 cepas de *Aspergillus flavus* con morfotipo L, AFLA (-), ACP (-) y de tipo de apareamiento MAT1-1 que serían buenas candidatas como agentes de control biológico por exclusión competitiva en la formulación de inóculos simples o mixtos para la prevención de la contaminación con aflatoxinas a nivel de campo tanto en maní como en maíz.
- Dicho bioformulado se podría utilizar a nivel pre-cosecha con un efecto protector esperable también durante el almacenamiento.