



PRODUCCIONES CIENTÍFICAS. Sección: Ciencias de la Ingeniería, Agronomía y Tecnología.

Toxinas de *Fusarium* en el control de hormigas.

Autores: *Benitez Ahrendts, Marcelo Rafael.*

Dirección: mrba@uolmail.com.ar

Cátedra de Microbiología Agrícola, Facultad de Ciencias Agrarias.

Alberdi N° 47. (4600). San Salvador de Jujuy, Argentina. Tel: (0388)156856220.

Introducción:

Las especies de *Fusarium* son mohos del campo saprofiticos o fitopatogénicos. Aunque la patogenicidad de las cepas no está correlacionada con su capacidad para producir tricotecenos A y B en los medios de cultivo, las cepas más agresivas producen grandes cantidades de toxinas (Morin, L. et al.; 2000). Los tricotecenos C son producidos por *Myrothecium* y otros hongos. Los metabolitos tóxicos de los *Fusarium* tienen actividad contra insectos, nemátodos y otros organismos del suelo (Cayrol, J., 1989; Logrieco, A. et al.; 1998).

Mientras algunos investigadores están preocupados por una posible intoxicación de mamíferos como consecuencia del uso de las especies de *Fusarium* en el control biológico de malezas, otros investigan y promueven el uso de los metabolitos secundarios de este género como nuevos herbicidas (Morin, L. et al. ; 2000) debido a que algunos de ellos (tricotecenos) pueden ser fácilmente hidrolizados por los microorganismos del suelo (Bamburg and Strong, 1971).

Otro agente potencialmente insecticida es la surfactina, un lipopéptido cíclico biodegradable producido por algunas cepas de *Bacillus subtilis* que tiene la capacidad de reducir la tensión interfacial en soluciones acuosas y en mezclas hidrocarbonadas (Desai and Banat, 1997).

Se determinó la producción de tricotecenos por cepas de *Fusarium* y *Myrothecium*, y se investigó la acción insecticida de los extractos de los cultivos (puros o mezclados con lipopéptidos de *B. subtilis*) contra la hormiga negra podadora *Acromyrmex heyeri*.

Materiales y Métodos:

Cepas:

Las cepas de *Fusarium graminearum* Schwabe y *Fusarium sambucinum* Fuckel fueron aisladas de frutos almacenados de *Cucurbita ficifolia* y la de *Myrothecium verrucaria* (Alb. and Schw.) Ditm.:Fr. de *Medicago sativa* henificada. La cepa de *Fusarium semitectum* Berk. and Rav. provenía de la rizósfera de *Saccharum officinalis*. La cepa de *B. subtilis* (Ehrenberg) Cohn fue aislada de suelo.

Producción de tricotecenos:

Se cultivaron las cepas fúngicas en arroz húmedo estéril. Luego de incubar a 28 °C durante 2 semanas se extrajeron las toxinas con acetonitrilo-agua (84+16) y se evaporó el solvente en baño de agua hirviente (Steyn, P. et al.; 1991). Para el análisis se purificaron los extractos mediante pasaje por una columna de alúmina, carbón activado y coadyuvante de filtración (Romer, T., 1986). Se hicieron corridas en cromatofolios G60 (Merck) activados, usando como sistemas solventes tolueno-acetato de etilo-ácido fórmico (5+4+1) y cloroformo-acetona (3+2) (Betina, V., 1985). Los tricotecenos B se vieron bajo UV larga luego de rociar las placas con solución alcohólica de cloruro de aluminio y calentar a 110°C durante 5 minutos, mientras que los del tipo A fueron detectados de igual manera mediante la solución sulfúrica de ácido cromotrópico (Baxter, J. et al. ; 1983).

Producción de lipopéptidos:

Los cultivos en el medio sacarosa-asparagina-sales (Cercós, A., 1950) se incubaron a 28 °C durante 72 hs. Los filtrados se acidificaron con ácido clorhídrico hasta pH 2, se recogió el precipitado por centrifugación, se resuspendió en agua y se neutralizó (Sandrin, C. et al.; 1990). Se comprobó que la cepa producía principalmente surfactina mediante corrida, junto al testigo puro (Sigma) sobre cromatofolio G60 (Merck) activado, con cloroformo-metanol-agua (65+25+4) (Besson, F. et al. ; 1978) y rociado con agua para visualizar.

Hormigas:

Los ensayos de la acción insecticida se hicieron sobre la hormiga negra podadora local identificada como *Acromyrmex heyeri*. Fueron recolectadas por succión del hormiguero con una bomba de vacío y distribuidas en matraces de Erlenmeyer. Se rociaron 0,3 mL de cada solución a cada grupo de 30 hormigas.

Diseño experimental y análisis estadístico:

Se aplicó un diseño completamente aleatorizado (Quinteros, H., 1997) donde cada unidad experimental constó de 30 hormigas, con 5 repeticiones por tratamiento, como variable aleatoria se usó el número de muertes realizando observaciones a las 24, 48 y 72 hs. Los datos obtenidos se sometieron al análisis de varianza ($\alpha = 0,01$).

Resultados y Discusión:

Cromatografía de metabolitos tóxicos.

El cuadro 1 indica que los extractos fúngicos contenían tricotecenos A y B. El contenido de toxinas en los extractos de *F. sambucinum* era de 31 $\mu\text{g/mL}$.

Cuadro 1: Número de manchas identificadas como tricotecenos en la cromatografía de los extractos fúngicos.

Especies	Tricotecenos A	Tricotecenos B	Tricotecenos C
<i>F. graminearum</i>	2	4	-
<i>F. sambucinum</i>	5	2	-
<i>F. semitectum</i>	2	3	-
<i>M. verrucaria</i>	-	-	5*

*análisis realizado por la Dra. E. Varsavky.

Las toxinas de *M. verrucaria* eran verrucarinas A y J, y roridinas A, D y E.

Según la bibliografía (Pitt and Hocking, 1997) *F. graminearum* produce toxina T-2, toxina HT-2, diacetoxiscirpenol, neosolaniol, desoxinivalenol, nivalenol y derivados; *F. semitectum* produce toxina T-2, diacetoxiscirpenol, neosolaniol, fusarenona X y nivalenol; *F. sambucinum* forma diacetoxiscirpenol entre otras toxinas. Las toxinas T-2, HT-2 neosolaniol, y diacetoxiscirpenol son tricotecenos del tipo A mientras que fusarenona X, desoxinivalenol y nivalenol son del tipo B (Steyn, P. et al. ; 1991).

Tratamiento con los extractos tóxicos:

El tratamiento con los extractos de toxinas produjo la muerte de todas las hormigas al cabo de 72 hs, pero *F. sambucinum* las mató en menos de 24 horas. No hubo diferencias significativas ($\alpha = 0,01$) entre los tratamientos hechos con las toxinas de los 4 hongos, observados a las 24, 48 y 72 horas posteriores a la aplicación.

La toxina T-2 es uno de los metabolitos fúngicos más estudiados por su actividad frente a insectos (Dowd, P., 1992). Otro metabolito secundario producido *F. sambucinum* es la beauvericina, un péptido cíclico con propiedades insecticidas, que también es producido por *F. semitectum* pero no por *F. graminearum* (Logrieco, A. et al.; 1998).

Tratamientos con extracto de *F. sambucinum* y lipopéptido de *B. Subtilis*:

Se hicieron mezclas del extracto fúngico y el lipopéptido húmedo, aplicados sobre cada unidad experimental en los diez tratamientos según se muestra en el cuadro 2.

Cuadro 2. Mezclas de micotoxinas y lipopéptidos aplicadas en un volumen de 0,3 mL sobre cada unidad experimental de 30 hormigas en los 10 tratamientos con 5 repeticiones cada uno.

Tratamiento	Extracto fúngico $\mu\text{L/mL}$	Lipopéptido húmedo mg/mL
1	Puro	0
2	0	21,6
3	500	10,8
4	250	16,2
5	125	18,9
6	62,5	20,3
7	15,6	21,6
8	7,8	21,6
9	4,5	2,2
10	18	2,2

Los tratamientos del 1 al 8 fueron efectivos para matar las hormigas, de los cuales el 8 contenía la menor cantidad de micotoxinas de *F. sambucinum* (72,5 μg) aplicada a cada unidad experimental y produjo un 100% de muertes a las 72 horas, mientras que el tratamiento 2 contenía solamente lipopéptidos. Por otra parte el tratamiento 9 representó aproximadamente la dosis letal media.

Los resultados presentaron diferencias estadísticas ($\alpha = 0,01$) entre los tratamientos observados a las 24, 48 y 72 horas. Los valores obtenidos se sometieron a una comparación de medias por la prueba de Tukey. A las 24 horas no hubo diferencias significativas entre los tratamientos del 1 al 8, pero fueron altamente significativas entre 9 y 10, también la diferencia fué altamente significativa entre los tratamientos 1-8 y 9-10. A las 48 y 72 horas no hubo diferencias significativas entre los tratamientos del 1 al 8, y fué altamente significativa la diferencia entre los tratamientos 9 y 10, como también entre éstos últimos respecto a los tratamientos del 1 al 8.

Se observó que el agregado de lipopéptidos como la surfactina permitió reducir grandemente la cantidad de extracto tóxico, el cual contenía tricotecenos, porque los emulsionantes tensoactivos pueden impedir la respiración de los insectos por taponamiento de los espiráculos.

Las micotoxinas pueden jugar un rol defensivo contra los insectos, de los cuales los no adaptados (como las orugas) son muy sensibles a estos metabolitos tóxicos. Estas toxinas pueden interactuar con los metabolitos de plantas u otros organismos, ser alteradas y potencialmente sinergizadas (Dowd, P., 1992), sin embargo los coleópteros resistentes son vectores de muchos hongos toxigenicos.

Conclusión:

La combinación de las toxinas de *F. sambucinum* y la surfactina junto a otros lipopéptidos de *B. subtilis* fué eficaz para el control de las hormigas podadoras *Acromyrmex heyeri*. Debido a que los tricotecenos son tóxicos para los mamíferos, este tipo de control biológico sólo puede aplicarse en explotaciones forestales, ornamentales y campos de golf, aún cuando sean biodegradables.

El presente trabajo se realizó mediante una beca de pre-grado acordada por la Secretaría de Ciencia, Técnica y Estudios Regionales de la Univ. Nac. de Jujuy, bajo la dirección de la Dra. Leonor Carrillo y la co-dirección de Dra. Susana Muruaga.

Agradecimientos a la Dra. F. Cuezco (Instituto Superior de Entomología, Tucumán) por la confirmación de la especie de hormiga, a la Ing. Agr. G. Lori (Fac. de Agronomía, La Plata) por la provisión de la cepa de *F. semitectum*, a la Dra. E. Varsavsky (Instituto Nacional de Medicamentos, Bs. As.) por el análisis de los extractos de *M. verrucaria* y a la Dra. Carrillo (Fac. de Cs. Agrarias, Jujuy) por la revisión del manuscrito.

Bibliografía:

- Bamberg JR, Strong FM. 1971. 12,13-Epoxytrichothecenes. En: Kadis S, Ciegler A, Aji S, eds. Microbial Toxins, vol. 7. Academic Press, London, pp. 207-292.
- Baxter JA, Terhune S, Qureshi S. 1983. Use of chromotropic acid for improved thin-layer chromatographic visualization of trichothecene mycotoxins. Journal of Chromatography 261: 130-133.
- Besson F, Peypoux F, Michel G, Delcambe L. 1978. Identification of antibiotics of iturin group in various strains of *Bacillus subtilis*. J. Antibiotics 31: 284-288.
- Betina V. 1985. Thin-layer chromatography of mycotoxins. Journal of Chromatography 334: 211-276.
- Cayrol JC. 1989. Les toxines nematocides des champignons. P.H.M. Revue Horticole 293: 55-58.
- Cercós AP. 1950. Antibiótico (fungocina) producido por *Bacillus subtilis*, con actividad sobre hongos patógenos de animales y vegetales. Revista de Investigaciones Agrícolas 4: 325-335.
- Desai JD, Banat IM. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61: 47-64.
- Dowd PF. 1992. Insect interactions with mycotoxin producing fungi and their hosts. En: Bhatnagar D, Lillehoj E, Arora D, eds. Mycotoxins in ecological systems. Marcel Dekker, New York, pp. 137-155.
- Logrieco A, Moretti A, Castella G, KostECKI M, Golinski P, Ritieni A, Chelkowski J. 1998. Beauvericin production by *Fusarium* species. Applied Environmental Microbiology 64: 3084-3088.
- Morin L, Gianotti AF, Lauren DR. 2000. Trichothecene and pathogenicity of *Fusarium tumidum*, a candidate bioherbicide for gorse and broom in New Zealand. Mycological Research 104: 993-999.
- Pitt J, Hocking A. 1997. Fungi and food spoilage. 2º ed. Blackie Academic & Professional, London.
- Quinteros HO. 1997. Diseño experimental. Facultad de Ciencias Agrarias, Jujuy.
- Romer TR. 1986. Use of small charcoal / alumina cleanup columns in determination of trichothecene mycotoxins in foods and feeds. Journal of AOAC. 69: 699-703.
- Sandrin C, Peypoux, Michel G. 1990. Coproduction of surfactin and iturin A, lipopeptides with surfactant and antifungal properties, by *Bacillus subtilis*. Biotech. Appl. Biochem. 12: 370-375.
- Steyn PS, Thiel PG, Trinder DW. 1991. Detection and quantification of mycotoxins by chemical analysis. En: Smith JE, Henderson RS, eds. Mycotoxins and animal foods. CRC Press, Boca Raton, pp. 165-221.