



Original

Determinación de perfiles de producción de metabolitos secundarios característicos de especies del género *Alternaria* aisladas de tomate

Martha Elizabeth Benavidez Rozo, Andrea Patriarca, Gabriela Cabrera y Virginia E. Fernández Pinto*

Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 27 de febrero de 2013

Aceptado el 3 de septiembre de 2013

On-line el 23 de septiembre de 2013

Palabras clave:

Alternaria

Metabolitos secundarios

Tomate

Mycotoxinas

R E S U M E N

Antecedentes: Muchas especies de *Alternaria* han sido estudiadas por su capacidad de producir metabolitos secundarios bioactivos como la tentoxina (TEN), algunos de los cuales tienen propiedades tóxicas. Las principales toxinas de *Alternaria* contaminantes de alimentos son el ácido tenuazónico, el alternariol (AOH), el alternariol monometil éter (AME), el altenueno y las altertoxinas I, II y III.

Objetivos: Determinar los perfiles de metabolitos secundarios característicos de cepas de *Alternaria* aisladas de tomate para su clasificación quimiotaxonómica.

Métodos: Los perfiles de metabolitos secundarios se determinaron por HPLC-MS.

Resultados: Los aislamientos de *Alternaria* obtenidos a partir de tomates con «enmohecimiento negro» pertenecen, según sus características morfológicas, a los grupos especie *Alternaria alternata*, *Alternaria tenuissima* y *Alternaria arborescens*, siendo *A. tenuissima* el más frecuentemente aislado. Se determinaron los perfiles más característicos de metabolitos secundarios de los grupos especie *A. alternata* (AOH, AME, TEN), *A. tenuissima* (AOH, AME, TEN, ácido tenuazónico) y *A. arborescens* (AOH, AME, TEN, ácido tenuazónico), siendo algunas cepas de este último grupo especie capaces de sintetizar toxinas AAL.

Conclusiones: Los perfiles de producción de metabolitos secundarios son una herramienta útil para la diferenciación de aislamientos de *Alternaria* pertenecientes a grupos especie de esporas pequeñas difícilmente identificables por sus características morfológicas.

© 2013 Revista Iberoamericana de Micología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Determination of the profiles of secondary metabolites characteristic of *Alternaria* strains isolated from tomato

A B S T R A C T

Keywords:

Alternaria

Secondary metabolites

Tomato

Mycotoxins

Background: Many *Alternaria* species have been studied for their ability to produce bioactive secondary metabolites, such as tentoxin (TEN), some of which have toxic properties. The main food contaminant toxins are tenuazonic acid, alternariol (AOH), alternariol monomethyl ether (AME), altenuene, and altertoxins I, II and III.

Aims: To determine the profiles of secondary metabolites characteristic of *Alternaria* strains isolated from tomato for their chemotaxonomic classification.

Methods: The profiles of secondary metabolites were determined by HPLC MS.

Results: The *Alternaria* isolates obtained from spoiled tomatoes belong, according to their morphological characteristics, to the species groups *Alternaria alternata*, *Alternaria tenuissima* and *Alternaria arborescens*, with *A. tenuissima* being the most frequent. The most frequent profiles of secondary metabolites belonging to the species groups *A. alternata* (AOH, AME, TEN), *A. tenuissima* (AOH, AME, TEN, tenuazonic acid) and *A. arborescens* (AOH, AME, TEN, tenuazonic acid) were determined, with some isolates of the latter being able to synthesize AAL toxins.

Conclusions: Secondary metabolite profiles are a useful tool for the differentiation of small spored *Alternaria* isolates not easily identifiable by their morphological characteristics.

© 2013 Revista Iberoamericana de Micología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

* Autor para correspondencia.

Correos electrónicos: virginia@qo.fcen.uba.ar, virginiaferpin@gmail.com (V.E. Fernández Pinto).

Las especies del género *Alternaria* están presentes con frecuencia en una amplia gama de hábitats diferentes, tales como semillas, plantas, productos agrícolas, el suelo y el aire. Las especies de *Alternaria* se asocian comúnmente con enfermedades en varias plantas¹⁷. Este género posee una amplia diversidad morfológica, lo cual ha permitido una serie de intentos de organizar a los taxones en grupos a partir de los caracteres morfológicos^{4,10,29,32,33}. Dentro del género *Alternaria*, las especies se definen generalmente por las características del conidio, incluyendo el tamaño, la tabicación, presencia y ausencia de pico y el modelo de concatenación. Teniendo en cuenta la medida del conidio se establecieron 2 grupos: el de «esporas grandes» (tamaño del conidio en un rango de [50-]60-100 μm) y el de «esporas pequeñas» (tamaño de conidio menor de 60 μm). Dentro del grupo de esporas grandes se encuentran especies como *Alternaria dauci*, *Alternaria porri* y *Alternaria allii*. Las especies de esporas pequeñas son el grupo más común en alimentos, encontrándose en dicho grupo *Alternaria tenuissima*, *Alternaria alternata* y *Alternaria arborescens*. Particularmente, las especies de *Alternaria* de esporas pequeñas son un grupo difícil de clasificar debido a sus pocos caracteres morfológicos característicos, lo que dificulta la discriminación clara entre especies⁴. Para resolver esta imposibilidad de distinción morfológica de los aislamientos se presentó un método para segregar especies de *Alternaria* productoras de esporas pequeñas en grupos de morfoespecies (grupos especie) identificables en base a diferentes modelos de esporulación^{32,33}. Aun así es difícil caracterizar morfológicamente a las distintas especies dentro de un grupo. Una identificación correcta y precisa de estas especies es necesaria porque la especie reconocida bajo un determinado nombre representa un determinado conjunto de caracteres, como la preferencia de crecimiento en determinados sustratos, la interacción con el hospedador y la producción de metabolitos, lo que permite predecir su comportamiento^{2,5,11,26,31}. Estas especies tienen la capacidad de producir metabolitos secundarios, que pueden desempeñar un papel importante en la patogénesis de las plantas, y también ser tóxicos para el hombre y los animales^{17,18}. Entre los principales metabolitos secundarios tóxicos producidos se han reportado el ácido tenuazónico (TeA), el alternariol monometil éter (AME), las altertoxinas I, II y III, el altenueno (ALT), la curvularina (CURV) y la dehidrocurvularina (DHCURV)^{1,8,23,35}. Las micotoxinas de *Alternaria* se producen ampliamente en muchos productos alimenticios, en los que a menudo pueden presentarse junto a micotoxinas producidas por especies de hongos pertenecientes a otros géneros. El consumo de estos productos puede, por lo tanto, contribuir a un aumento en la ingestión de las micotoxinas en la dieta humana. Sin embargo, los datos sobre la presencia de toxinas de *Alternaria* en los alimentos son demasiado limitados para hacer una evaluación de la exposición a estas micotoxinas^{16,17}.

El perfil característico de los metabolitos secundarios puede ser de utilidad en la clasificación de las especies dentro del género como una herramienta adicional al uso de caracteres morfológicos que, como en el caso de algunas estructuras de reproducción, no se diferencian en las condiciones de laboratorio¹². Con el avance de las técnicas moleculares, varios estudios han examinado las relaciones taxonómicas entre las especies de *Alternaria* productoras de esporas pequeñas usando una variedad de métodos, en un intento de establecer consensos con las distintas clasificaciones basadas en características morfológicas. Los estudios moleculares muestran que este grupo de especies posee poca resolución en su filogenia molecular²⁶. Un enfoque polifásico incluyendo la morfología, los análisis moleculares y el perfil de los metabolitos secundarios puede aportar diversos marcadores que permitan caracterizar los distintos aislamientos del género *Alternaria*³. El objetivo del presente trabajo fue determinar los perfiles de metabolitos secundarios característicos de cepas de *Alternaria* aisladas de tomate mediante HPLC-espectrometría de masas (MS), para utilizarlos en la clasificación de este género fúngico.

Materiales y métodos

Muestreo

Se recolectaron frutos de tomate afectados por «enmohecimiento negro» en las localidades de La Plata, Florencio Varela y San Pedro, de la provincia de Buenos Aires, Argentina. Las muestras fueron enviadas al Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad de Buenos Aires, donde se conservaron a 4°C hasta el momento del análisis.

Cultivos de referencia

Se contó con 4 cultivos de referencia provenientes de la colección del Dr. Emmory G. Simmons, Indiana, EE. UU., para ayudar a la clasificación morfológica: *A. alternata* (EGS 34128), *A. tenuissima* (EGS 34015), *A. arborescens* (EGS 39128) y *A. infectoria* (EGS 27193). Los cultivos de referencia están disponibles en la colección del CBS Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, Países Bajos. Se ensayó el perfil de metabolitos de estos 4 cultivos: *A. alternata* (alternariol [AOH], alternariol monometil éter [AME], ALT), *A. tenuissima* (TeA, AOH, AME), *A. arborescens* (TeA, AOH, AME; AAL TA); *A. infectoria* no produce ninguno de los metabolitos estudiados.

Aislamiento

Con el objeto de obtener cultivos puros de *Alternaria*, se tomaron con un bisturí estéril fragmentos de tejido de la zona de tomate infectada. Se colocaron sobre placas de Petri con medio dicloran-cloranfenicol-malta-agar²⁵ y fueron incubados a 25°C durante 7 días. Preparaciones hechas a partir de las colonias que mostraron características distintivas del género *Alternaria* (micelio oscuro y reverso negro) fueron observadas microscópicamente para la confirmación del género, basada en la presencia de dictiosporas. Cada una de las colonias obtenidas en las placas de aislamiento general fueron reaisladas por inoculación con ansa de pequeños trozos de micelio o esporas a placas con medio de cultivo dicloran-cloranfenicol-malta-agar e incubadas hasta su esporulación a 25°C.

Caracterización de los aislamientos

Identificación morfológica

Para la caracterización morfológica los aislamientos fueron sembrados en agar papa zanahoria²⁵ e incubados a 25°C durante 7 días en ciclos alternantes de luz-oscuridad (8-16 h). Una vez obtenidos los cultivos monospóricos²⁰ se procedió a la determinación del grupo especie al que cada aislamiento pertenecía según su modelo de esporulación^{32,33}.

Producción de metabolitos secundarios

A partir de los cultivos monospóricos de 7 días a 25°C en agar papa zanahoria se extrajeron porciones de 5 mm de diámetro que se sembraron en 7 cajas de Petri con medios inductores de la producción de metabolitos secundarios: agar dicloran-Rosa de Bengala-extracto de levadura-sacarosa, agar extracto de malta, agar sacarosa extracto de levadura, agar avena, agar papa sacarosa, agar sacarosa nitrato³ y agar tomate²⁷. Todos los medios fueron incubados a 25°C durante 14 días en oscuridad.

Extracción de los metabolitos secundarios

Se realizó siempre la extracción de 2 porciones de 5 mm de diámetro del medio de la colonia, de cada uno de los cultivos que crecían en los 7 medios inductores de la producción de metabolitos. Las 7 porciones se colocaron en un recipiente adecuado y se

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/3418765>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/3418765>

[Daneshyari.com](https://daneshyari.com)