REVISTA CUBANA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
http://www.rccb.uh.cu

COMUNICACIÓN BREVE

Caracterización de esclerocios de cepas ambientales de *Aspergillus flavus* y su relación con la producción de micotoxinas

Characterization of sclerotia from environmental strains of Aspergillus flavus *and their relationship with the mycotoxins production*

Ian Pérez Ramírez* **y Kenia C. Sánchez Espinosa**

Facultad de Biología,
Universidad de La Habana,
Cuba

* Autor para correspondencia:
iperez@fbio.uh.cu

RESUMEN

Aspergillus flavus Link es un hongo frecuentemente aislado en estudios ambientales. Es una especie productora de esclerocios, aspecto fenotípico que se ha relacionado con la producción de aflatoxinas y ácido ciclopiazónico. El objetivo de este estudio fue analizar las características de los esclerocios de cepas ambientales de *A. flavus* por su relación con la biogénesis de micotoxinas. Se midieron los esclerocios de 14 cepas de la Colección de Cultivos Microbianos de la Facultad de Biología y se realizó la detección cualitativa de aflatoxinas y ácido ciclopiazónico. Todos los esclerocios producidos por las cepas fueron del morfotipo L (> 400µm) y no se detectó la presencia de aflatoxinas ni de ácido ciclopiazónico. El conocimiento de las características morfológicas de estas estructuras de resistencia y su relación con la biogénesis de micotoxinas en las poblaciones de esta especie contribuye al conocimiento de su diversidad en el neotrópico.

Palabras clave: hongos, ambiente, aflatoxinas, ácido ciclopiazónico

ABSTRACT

Aspergillus flavus Link is frequently isolated fungi in environmental studies. This species produces sclerotia, a phenotypic feature that has been related to the production of aflatoxins and cyclopiazonic acid. The objective of this study was to analyze the characteristics of the sclerotia of environmental strains of *A. flavus* due to their relationship with mycotoxin biogenesis. The sclerotia of 14 strains from the Microbial Culture Collection of the Faculty of Biology were measured and the qualitative detection of aflatoxins and cyclopiazonic acid was performed. All sclerotia produced were of the L morphotype (> 400 µm) and the presence of aflatoxins or cyclopiazonic acid was not detected. Knowledge of the morphological characteristics of these resistance structures and their relationship to the biogenesis of mycotoxins in populations of this species contributes to knowledge of their diversity in the neotropics.

Keywords: *fungi, environment, aflatoxins, cyclopiazonic acid*

Recibido: 2020-01-20

Aceptado: 2020-03-31

INTRODUCCIÓN

El género *Aspergillus* se divide en seis subgéneros: (Circumdati, Nidulantes, Aspergillus, Fumigati, Polypaecili y Cremei), según el análisis filogenético, los caracteres fenotípicos y fisiológicos. Cada subgénero se divide en varias secciones de especies estrechamente relacionadas (Rudramurthy *et al*., 2019). La sección *Flavi* del subgénero Circumdati contiene especies que producen varias micotoxinas como aflatoxinas, ácido 3-nitropropiónico, ácido tenuazónico y ácido ciclopiazónico (Frisvad *et al*., 2019). Dentro de los principales especies productoras de aflatoxinas y ácido ciclopiazónico en productos alimenticios destaca *Aspergillus flavus* (Uka *et al*., 2017; Perrone y Gallo, 2017). Las aflatoxinas tienen efectos carcinogénicos y mutagénicos en animales y humanos. Además, pueden ser inmunosupresoras ya que inhiben la fagocitosis y la síntesis de proteínas (Zahra *et al*., 2019). El ácido ciclopiazónico es un inhibidor específico de la ATPasa dependiente de calcio en el retículo sarcoplasmático, lo que resulta en concentraciones celulares alteradas de Ca^{2+} (Duran *et al*., 2007).

La mayoría de las especies de *Aspergillus* de la sección *Flavi* pueden producir esclerocios (Frisvad *et al*., 2014). Estas estructuras son agregados compactos de hifas pigmentadas, que resisten condiciones ambientales desfavorables y capaces de permanecer latentes durante largos períodos de tiempo (Cotty, 1989). Dentro de la variación fenotípica encontrada en los esclerocios para los aislamientos de esta especie, se establecen los morfotipos S y L. Las cepas S producen numerosos esclerocios menores a 400µm de diámetro y altas concentraciones de aflatoxinas (Chang *et al*., 2002). A diferencia de las cepas L, que producen escasos esclerocios, mayores de 400µm de diámetro y menor concentración de aflatoxinas (Bayman y Cotty, 1993; Horn *et al*., 2014).

Las condiciones climáticas y geográficas son determinantes en la prevalencia y distribución local de *A. flavus*. Esta especie es frecuente en países tropicales como India, México, Pakistán, Sudán y Arabia Saudita (Rudramurthy *et al*., 2019). Varios estudios realizados en Cuba la informan como abundante y frecuente en ambientes interiores y exteriores (Almaguer y Rojas, 2013; Borrego y Perdomo, 2016; Sánchez *et al*., 2019). Entre las cepas de *A. flavus* existe una gran diversidad morfológica y toxigénica, por lo que la determinación de ambas características puede brindar información útil para las prácticas agronómicas locales.

El objetivo de este estudio fue analizar la relación entre los morfotipos de esclerocios y la producción de micotoxinas en cepas de *Aspergillus flavus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se midieron los esclerocios de 14 cepas ambientales de *A. flavus* aisladas del aire y de diferentes sustratos (Tabla 1), que se encuentran conservadas en la Colección de Cultivos Microbianos de la Facultad de Biología (CCMFB). Para ello, se inocularon las cepas en placas Petri con medio CYA (de sus siglas en inglés *Czapek Yeast Extract Agar*), se incubaron a 28°C y se observó la aparición de los esclerocios desde los 7 hasta los 14 días. Posteriormente, para disminuir la exposición de las investigadoras a los conidios, se colocaron las placas en una cámara desecadora con dietil éter por 24 horas y después se lavaron con etanol. Se tomaron los esclerocios y se fijaron en portaobjetos con PVA (de sus siglas en inglés *Polyvinyl alcohol*). Se determinó la forma y coloración de cincuenta esclerocios de cada cepa al microscopio estereoscopio y se midieron en un microscopio de campo claro Trinocular Zoel modelo N-2000 con lente micrométrico. Los resultados de las mediciones se expresaron con el promedio y su desviación estándar. Los esclerocios con dimensiones superiores a 400 µm se consideraron tipo L (del inglés *large*), mientras que aquellos con diámetro inferior a 400 µm se consideraron tipo S (del inglés *small*), según los criterios de Pildain *et al*. (2004).

Para la detección cualitativa de ácido ciclopiazónico se utilizaron discos de papel de filtro embebidos en el reactivo de Ehrlich (4-dimetilaminobenzaldehído, disuelto en etanol al 96% y ácido clorhídrico al 37%), según la metodología propuesta por Frisvad y Samson (2004) y aplicada por Samson *et al*. (2007) para la Sección *Nigri* del género *Aspergillus*. La prueba se consideró positiva con la aparición de un anillo coloreado (violeta, rosado, rojo o amarillo) en el papel y se determinó el tiempo de la reacción. Para la determinación cualitativa de aflatoxinas se sembraron las cepas en agar arroz (AA) modificado (32g de arroz, 8g de agar en 1L de agua destilada, pH 6). Se inocularon suspensiones de conidios en el centro de series de tubos que se incubaron en la oscuridad durante 10 días. El reverso de los cultivos se examinó periódicamente (2, 3, 7 y 10 días) bajo UV de onda larga (365nm) para observar la emisión de fluorescencia, con un tubo no inoculado como control (Cutuli *et al*., 1991).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las cepas de *A. flavus* evaluadas presentaron esclerocios marrones de formas variadas y con un diámetro de 603-1035 µm (Fig. 1). En este sentido, Frisvad *et al*. (2019) señalan que las cepas de *A. flavus* producen generalmente esclerocios globosos o subglobosos de 400 –700 µm, aunque en algunas cepas se pueden encontrar esclerocios más pequeños y uniformes. Asimismo, Perrone y Gallo (2017) informaron que en general, la sección *Flavi* incluye especies con esclerocios oscuros, pequeños y alargados.

Todos los esclerocios producidos por las cepas de *A. flavus* fueron del morfotipo L (> 400µm de diámetro) (Tabla 1). Probst *et al*. (2010) demostraron que las cepas de morfotipo L pueden ser toxigénicas o no toxigénicas. En este estudio ninguna de las cepas produjo aflatoxinas en el medio natural AA modificado, ni se detectó producción de ácido ciclopiazónico. Varios autores han informado que poblaciones de *A. flavus* con esclerocios tipo L, asociados a diferentes cultivos agrícolas, pueden producir solo aflatoxina B o no producir aflatoxinas (Novas y Cabral, 2002; Molo *et al*., 2019). Houbraken *et al*. (2014) señalaron que aproximadamente el 60% de las cepas de *A. flavus* no producen aflatoxinas. Adicionalmente, existen formas domesticadas de esta especie que han perdido la propiedad de producir esta toxina (Frisvad *et al*., 2019). En contraste, Pildain *et al*. (2004) y Chang (2009) han correlacionado la morfogénesis de estas estructuras con la biogénesis de micotoxinas. Debido a que la producción de esclerocios, ácido ciclopiazónico, aflatoxinas B1 y B2 se encuentra regulada por la expresión del gen *veA* (Duran *et al.*, 2007). La eliminación de este gen interrumpe o modula negativamente la producción de toxinas y el desarrollo de los esclerocios, según han comprobado Cary *et al*. (2007) y Amaike y Keller (2009). La evaluación cuantitativa de micotoxinas mediante la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, por sus siglas en inglés *high-performance liquid chromatography*), el ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA, por sus siglas en inglés *enzyme-linked immunosorbent assay*) y la cromatografía de capa fina (TLC, por sus siglas en inglés *thin layer chromatography*) pueden complementar los resultados obtenidos (Dehghan *et al*., 2008). Estos métodos son caros y requieren tiempo, por lo que la medición de esclerocios sería un paso previo en un tamizaje de grandes cantidades de cepas de esta abundante especie, especialmente en estudios ecológicos ambientales. En este sentido, Cutuli *et al*. (1991) demostraron mediante pruebas cualitativas de fluorescencia y TLC, la ausencia de aflatoxinas en medios naturales de cepas de *A. flavus*.

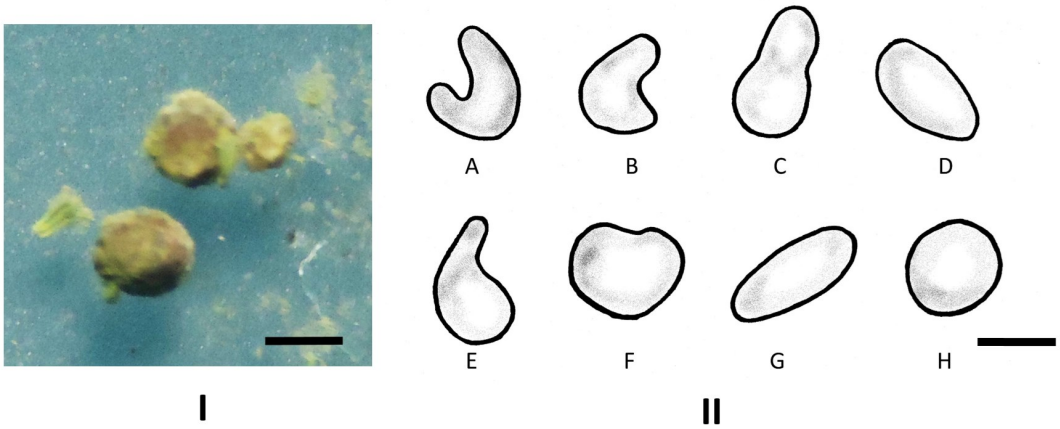

Figura 1. I-Fotografía de esclerocios de *A. flavus* al Microscopio Estereoscopio (10X) a los 14 días de incubación. II-Esquema de los esclerocios de las cepas estudiadas: esclerocios variables (A - F), esclerocio alargado (G) y esclerocio esférico (H). Barra: 700µm.

Figure 1. *I-Photograph of sclerotia from A. flavus to the Stereoscope Microscope (10X) at 14 days of incubation. II-Scheme of the sclerotia of the strains studied: variable sclerotia (A - F), elongated sclerotia (G) and spherical sclerotia (H). Bar: 700µm.*

Tabla 1. Procedencia, año de conservación y características morfológicas de los esclerocios de las cepas de *Aspergillus flavus* incluidas en el estudio.

Table 1. *Origin, year of conservation and morphological characteristics of the sclerotia of the* Aspergillus flavus *strains included in the study.*

Cepas	Procedencia	Año de conservación	Diámetro (µm)	Coloración	Forma
CCMFBH-80	Vitrina	2000	887 ± 157	Marrón	Esféricos
CCMFBH-105	Papel	2000	603 ± 79	Marrón	Esféricos
CCMFBH-109	Papel	2000	827 ± 102	Marrón	Alargados
CCMFBH-203	Textil	2003	913 ± 159	Marrón	Alargados
CCMFBH-569	Huesos conservados	2010	962 ± 89	Marrón	Esféricos
CCMFBH-573	Huesos conservados	2010	1039 ± 128	Marrón	Esféricos
CCMFBH-576	Huesos conservados	2010	829 ± 129	Marrón	Esféricos
CCMFBH-578	Huesos conservados	2010	687 ± 59	Marrón	Esféricos
CCMFBH-711	Aire exterior	2010	700 ± 136	Marrón	Irregulares
CCMFBH-708	Aire exterior	2015	1035 ± 207	Marrón	Esféricos
CCMFBH-693	Aire exterior	2015	1198 ± 324	Marrón	Irregulares
CCMFBH-721	Aire exterior	2014	2715 ± 324	Marrón	Esféricos
CCMFBH-736	Aire exterior	2015	764 ± 123	Marrón	Esféricos
CCMFBH-737	Aire exterior	2015	816 ± 126	Marrón	Esféricos

La mayoría de las investigaciones sobre la producción de micotoxinas están dirigidas a la detección de cepas toxigénicas en las áreas de cultivo y almacenamiento de alimentos (Martínez *et al*., 2013; Misihairabgwi *et al*., 2019; Yang *et al*., 2020). Sin embargo, en el aire se encuentran propágulos de varios hongos potencialmente micotoxigénicos, que pueden depositarse sobre diversos sustratos, crecer y producir dichas toxinas si las condiciones ambientales lo propician. La ingestión de estos metabolitos puede generar carcinogénesis, teratogénesis, inmunosupresión y cuadros clínicos de neurotoxicidad, nefrotoxicidad, hepatotoxicidad, mielotoxicidad, toxicidad pulmonar y endocrina (Serrano y Cardona, 2015). Por lo que reducir la emisión de aerosoles que contengan estos propágulos fúngicos tanto en ambientes interiores como exteriores constituyen una medida de prevención efectiva para mitigar sus efectos negativos.

LITERATURA CITADA

Almaguer, M. y Rojas, T.I. (2013). Aeromicota viable de la atmósfera de La Habana, Cuba. Nova Acta Científica Compostelana (Bioloxía), 20: 35-45.

Amaike, S., y Keller, N. P. (2009). Distinct roles for VeA and LaeA in development and pathogenesis of *Aspergillus flavus*. Eukaryotic cell, 8(7): 1051-1060.

Bayman, P., y Cotty, P. J. (1993). Genetic diversity in *Aspergillus flavus*: association with aflatoxin production and morphology. Canad. J. Bot., 71(1): 23-31.

Borrego, S., y Perdomo, I. (2016). Airborne microorganisms cultivable on naturally ventilated document repositories of the National Archive of Cuba. Environ. Sci. Pollut. Res., 23(4): 3747-3757.

Cary, J. W., OBrian, G. R., Nielsen, D. M., et al. (2007). Elucidation of veA-dependent genes associated with aflatoxin and sclerotial production in *Aspergillus flavus* by functional genomics. Appl Microbiol Biotechnol., 76(5): 1107.

Chang, P. K. (2009). Aflatoxin Biosynthesis and sclerotial development in Aspergillus flavus and *Aspergillus parasiticus*. Mycotoxins in Food, Feed and Bioweapons, Chapter 6: 77-92 pp. Springer, Berlin, Heidelberg.

Chang, P. K., Bennett, J. W., y Cotty, P. J. (2002). Association of aflatoxin biosynthesis and sclerotia ldevelopment in *Aspergillus parasiticus*. Mycopathologia, 153(1): 41-48.

Cotty, P. J. (1989). Virulence and cultural characteristics of two *Aspergillus flavus* strains pathogenic on cotton. Phytopathology, 79 (7): 808-814.

Cutuli, M. T., Cuellar, A., Camara, J. M., et al. (1991). Different media and methodologies for the detection of aflatoxin production by *Aspergillus flavus* strains isolated from trout feed. Mycopathologia, 113(2): 121-125.

Dehghan, P., Zeyni, F., Mahmoudi, M., et al. (2008). Aflatoxin and sclerotia production in clinical isolates of *Aspergillus flavus* group. Iran. J. Public Health, 37(2): 41-50.

Duran, R. M., Cary, J. W., y Calvo, A. M. (2007). Production of cyclopiazonic acid, aflatrem, and aflatoxin by *Aspergillus flavus* is regulated by veA, a gene necessary for sclerotial formation. Appl. Microbiol. Biotechnol., 73(5): 1158.

Frisvad, J. C., Hubka, V., Ezekiel, C. N., *et al.* (2019). Taxonomy of *Aspergillus* section *Flavi* and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. Stud. Mycol., 93: 1-63.

Frisvad, J. C., y Samson, R. A. (2004). Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate Penicillia and their mycotoxins. Stud. Mycol., 49(1): 1-174.

Horn, B. W., Sorensen, R. B., Lamb, M. C., *et al.* (2014). Sexual reproduction in *Aspergillus flavus* sclerotia naturally produced in corn. Phytopathology, 104(1): 75-85.

Houbraken, J., de Vries, R. P., Samson, R. A. (2014). Modern Taxonomy of Biotechnologically Important *Aspergillus* and *Penicillium* species. Adv. Appl. Microbiol., 199–249.

Martínez, V., García, A., Cabrera, Y. (2013). Nota sobre la contaminación microbiana e incidencia de micotoxinas en alimentos para cerdos en Cuba. Revista Computadorizada de Producción Porcina, 20(3): 133-135.

Misihairabgwi, J. M., Ezekiel, C. N., Sulyok, M., *et al.* (2019). Mycotoxin contamination of foods in Southern Africa: A 10-year review (2007–2016). Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 59(1): 43-58.

Molo, M. S., Heiniger, R. W., Boerema, L., y Carbone, I. (2019). Trial summary on the comparison of various non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus* on mycotoxin levels and yield in maize. Agron. J., 111(2): 942-946.

Novas, M. V., y Cabral, D. (2002). Association of mycotoxin and sclerotia production with compatibility groups in *Aspergillus flavus* from peanut in Argentina. Plant Disease, 86(3): 215-219.

Perrone, G., y Gallo, A. (2017). *Aspergillus* species and their associated mycotoxins. Mycotoxigenic Fungi. Chapter 3: 33-49 pp. Humana Press, New York, NY.

Pildain, M. B., Vaamonde, G., y Cabral, D. (2004). Analysis of population structure of *Aspergillus flavus from* peanut based on vegetative compatibility, geographic origin, mycotoxin and sclerotia production. Int. J. Food Microbiol., 93(1): 31-40.

Probst, C., Schulthess, F., y Cotty, P. J. (2010). Impact of *Aspergillus* section *Flavi* community structure on the development of lethal levels of aflatoxins in Kenyan maize (*Zea mays*). J. Appl. Microbiol., 108(2): 600-610.

Rudramurthy, S. M., Paul, R. A., Chakrabarti, A., et al. (2019). Invasive aspergillosis by *Aspergillus flavus*: epidemiology, diagnosis, antifungal resistance, and management. Journal of Fungi, 5(3), 55.

Samson, R. A., Noonim, P., Meijer, M., et al. (2007). Diagnostic tools to identify black aspergilli. Stud. Mycol., 59, 129-145.

Sánchez, K. C., Almaguer, M., Pérez, I., Rojas, T. I. y Aira, M. J. (2019). Diversidad fúngica en la atmósfera de La Habana (Cuba) durante tres períodos poco lluviosos.Rev. Int. Contam. Ambie., 35 (1): 137-150.

Serrano-Coll, H. A., & Cardona-Castro, N. (2015). Micotoxicosis y micotoxinas: generalidades y aspectos básicos. Ces Medicina, 29 (1), 143-151.

Uka, V., Moore, G., Arroyo-Manzanares, N., et al. (2017). Unravelling the diversity of the cyclopiazonic acid family of mycotoxins in *Aspergillus flavus* by UHPLC triple-TOF HRMS. Toxins, 9(1): 35.

Yang, C., Song, G., y Lim, W. (2020). Effects of Mycotoxin-Contaminated Feed on Farm Animals. J. Hazard. Mater., 389: 122087.

Zahra, N., Saeed, M. K., Sheikh, A., *et al.* (2019). A Review of Mycotoxin Types, Occurrence, Toxicity, Detection Methods and Control. Biological Sciences-PJSIR, 62(3): 206-218.

● ● ●