

Ana Figueroa¹, Soledad Diaz¹, Nestor Soria², Roxana Alasino^{1,3} y Dante Beltramo^{1,2,3}

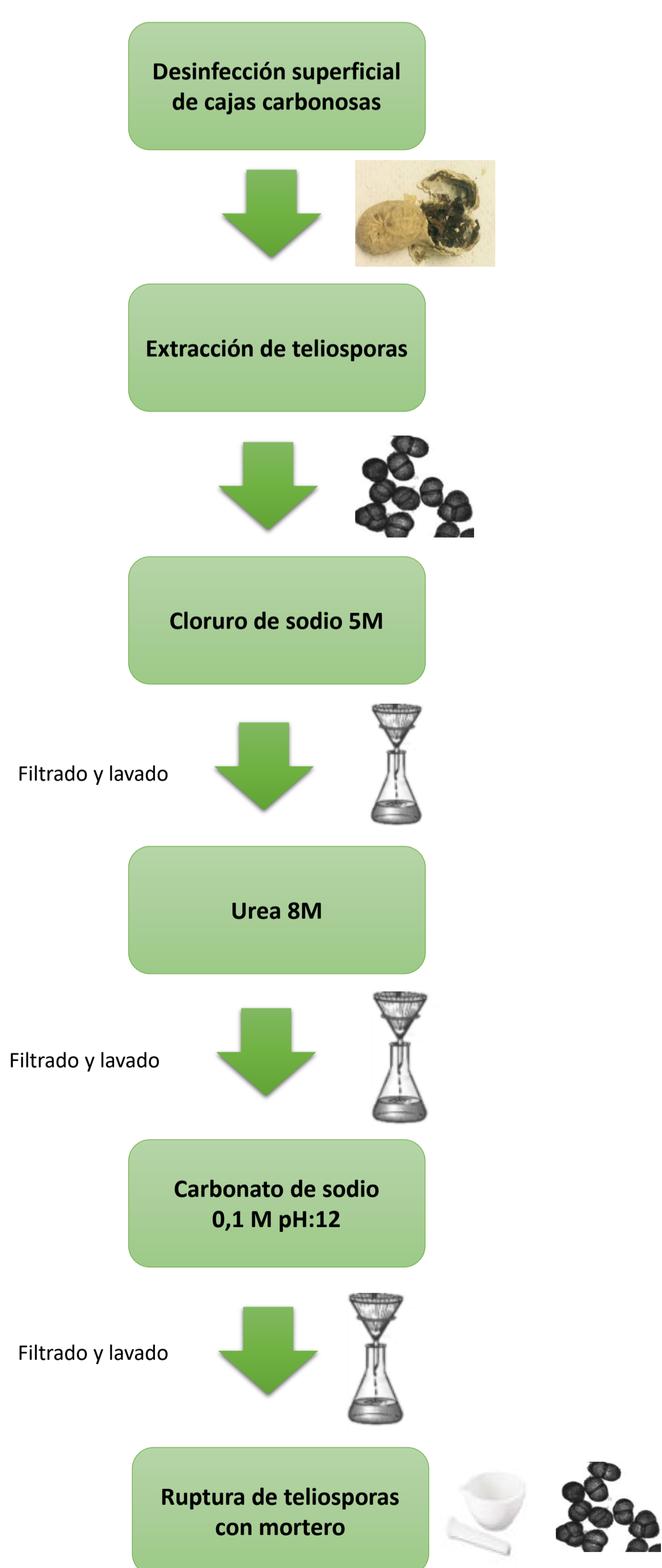
¹Centro de Excelencia en Productos y Procesos Córdoba. Sede Santa María de Punilla: Pabellón CEPROCOR, Córdoba, Argentina; ²Cátedra de Biotecnología, Facultad de Cs Químicas, Universidad Católica de Córdoba, Argentina; ³CONICET, Argentina. e-mail: anafigueroa05@yahoo.com.ar

INTRODUCCIÓN

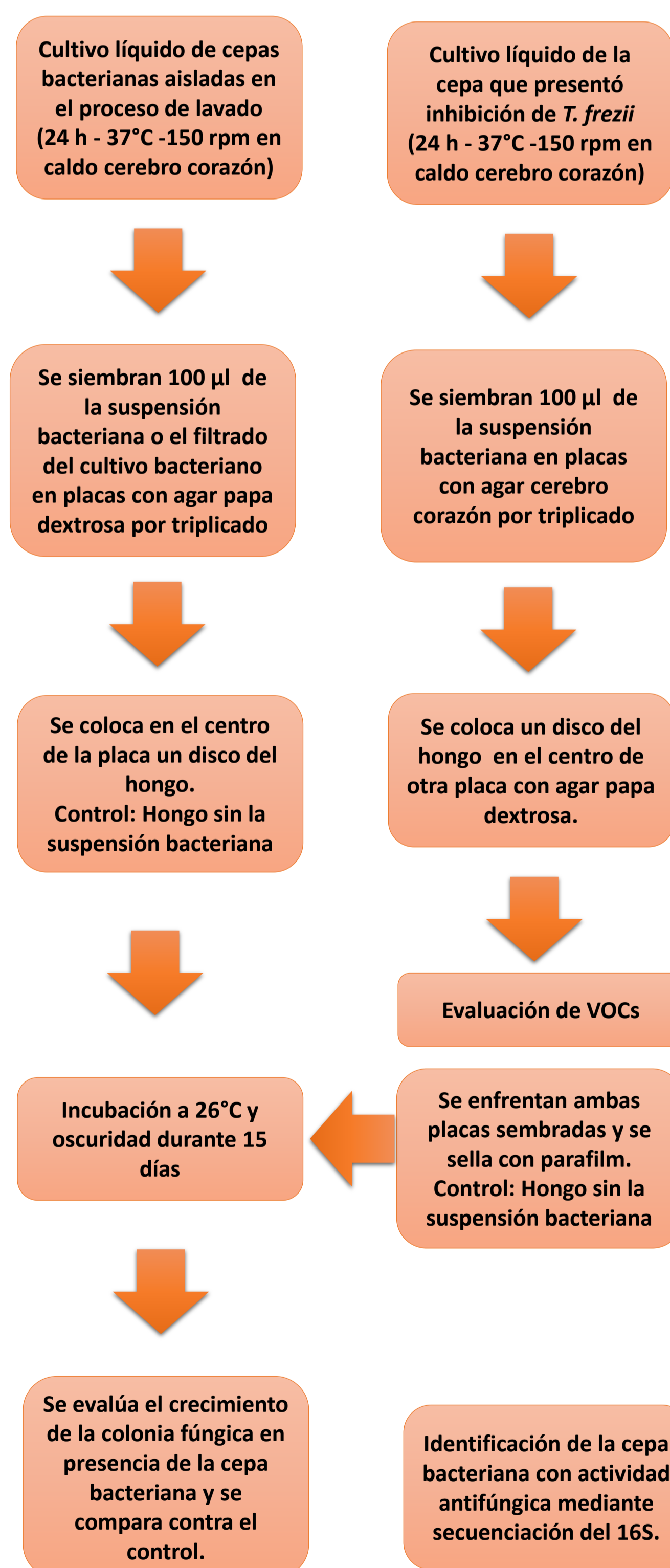
Argentina es el principal productor de maní de América Latina y el primer exportador mundial de maní. Este cultivo es afectado por numerosos hongos, entre ellos *Thecaphora frezii*, que afecta los granos convirtiéndolos en masas polvorientas de esporas. Las teliosporas sobreviven en el suelo y tienen escaso poder germinativo *in vitro*. Las pérdidas económicas ocasionadas por esta enfermedad son cuantiosas. Actualmente se investigan diferentes estrategias para controlar al patógeno. En trabajos previos, encontramos que existen bacterias fuertemente asociadas a las esporas. En función de esto, surgió la idea de estudiar si estas bacterias podrían estar afectando la germinación del hongo y de esa forma actuar como potencial biocontrolador. El objetivo de este trabajo fue aislar estas bacterias estrechamente relacionadas a las teliosporas de *T. frezii* y evaluar una potencial acción biológica contra este patógeno.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lavado secuencial para la extracción de bacterias asociadas a esporas de carbón de maní. Para aislar estas cepas bacterianas, teliosporas y filtrado de cada paso de lavado se sembraron en agar cerebro corazón.



Ensayos de antagonismo



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mediante un proceso de lavado secuencial de las esporas, se analizó el desarrollo de colonias bacterianas tanto en filtrados como en las teliosporas lavadas en cada paso. En el filtrado crecieron aquellas cepas que se despegaron de las esporas a causa del tratamiento específico. Para romper interacciones iónicas se utilizó alta fuerza iónica (cloruro de sodio 5M), para romper interacciones puente hidrógeno se lavó con urea 8M, y finalmente se utilizó una solución alcalina de carbonato de sodio que, además, disocia interacciones de tipo hidrofóbicas. Teniendo en cuenta esto, las cepas que crecieron cuando se sembraron las teliosporas lavadas son aquellas cepas que aun continúan interactuando con las esporas (Figura 1).

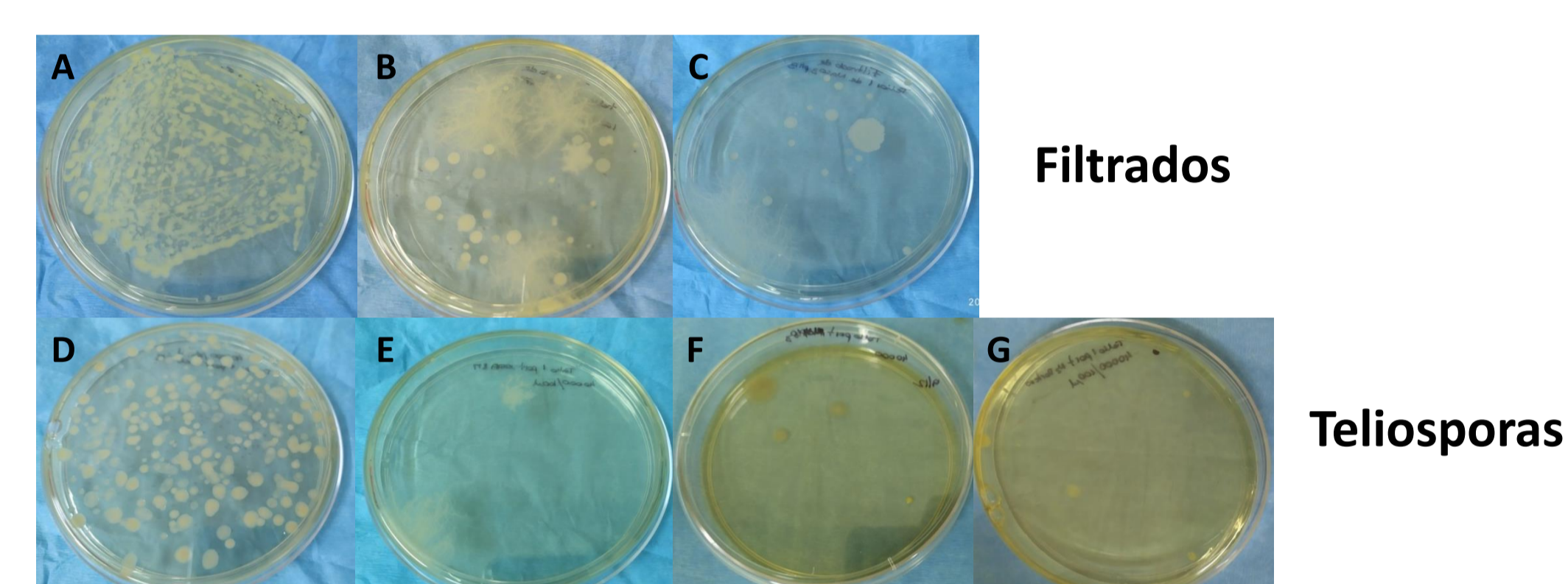


Figura 1: bacterias lavadas de las teliosporas (fila superior) y bacterias que aun interaccionan con las esporas (fila inferior), crecidas en agar cerebro corazón. Lavados con cloruro de sodio (A y D), Urea (B y E), Carbonato (C y F) y teliosporas rotas con mortero (G).

Para los ensayos de antagonismo se seleccionaron colonias que crecieron en el filtrado post carbonato y cepas que quedaron unidas a las teliosporas posterior al procesamiento con mortero. En total se ensayaron 6 cepas, tres cepas del filtrado y tres asociadas a las esporas. Solo la cepa 2 mostró actividad inhibitoria *in vitro* sobre hifas de *T. frezii* (Figura 2), esta cepa fue despegada de las esporas con el lavado de carbonato. El secuenciamiento del 16S reveló que la misma pertenece al género *Bacillus*.

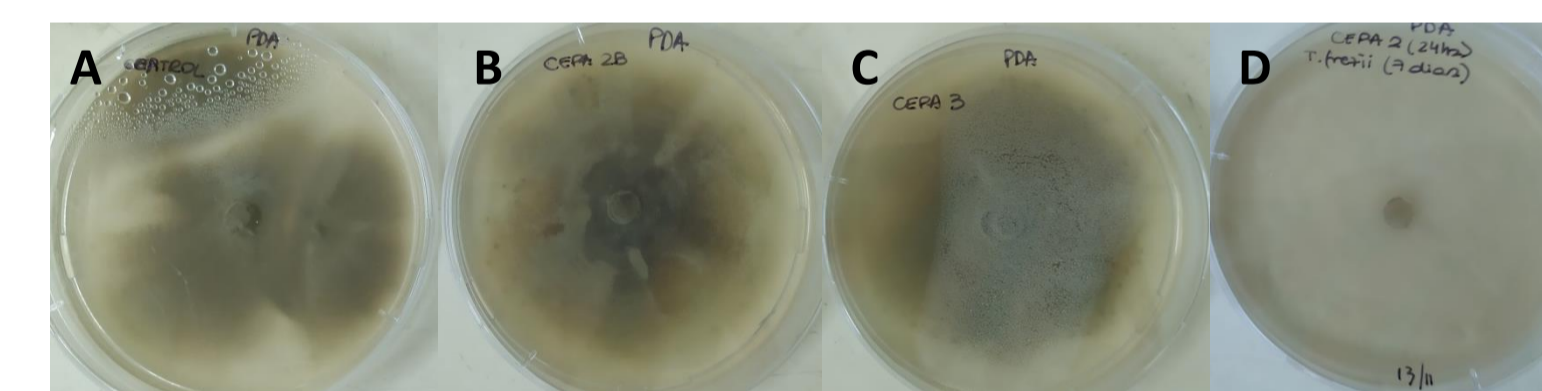


Figura 2: Ensayo de antagonismo. Desarrollo de la colonia de carbón en presencia de las cepas bacterianas. A) colonia de *T. frezii* (control sin bacterias), B) Hongo - cepa 2B, C) Hongo - cepa 3 y D) Hongo - cepa 2.

Los filtrados de los cultivos bacterianos no presentaron actividad inhibitoria *in vitro* frente a carbón. Para la cepa 2, evaluamos si la actividad antifúngica se debía a la producción de Compuestos orgánicos volátiles (VOCs). En la figura 3B se observa el crecimiento de la cepa 2 en la parte superior (tapa) mientras que no hubo desarrollo de la colonia de *T. frezii* (base de la placa donde solo se ve el disco sembrado), comparado contra la colonia control, la cual se desarrolla hasta el borde de la placa (3A). Cuando se repicó estos discos en otra placa de PDA, el control desarrolló normalmente mientras que el disco del hongo que estuvo expuesto a los VOCs no creció (figura 3C y D). Estos resultados demuestran que este *Bacillus* libera VOCs y que estos son los responsables de dicha actividad antifúngica.

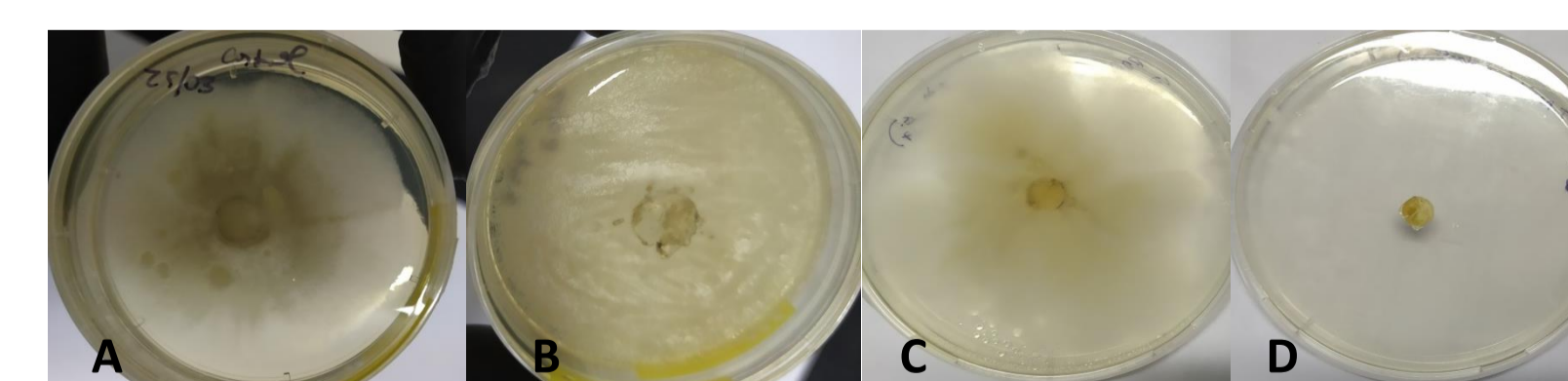


Figura 3: Ensayo de Antagonismo mediante VOCs producidos por la cepa 2. A) colonia de *T. frezii* (control sin bacteria), B) Hongo (base) - cepa 2 (tapa), C) repique del disco de placa A y D) repique del disco de placa B.

CONCLUSIONES

Aislamos una cepa bacteriana del género *Bacillus*, fuertemente asociada a las teliosporas de carbón de maní que mostró actividad inhibitoria *in vitro* sobre el crecimiento de hifas de *T. frezii* a través de la producción de VOCs. Estos resultados muestran que esta cepa bacteriana podría estar interviniendo en la escasa germinación de las esporas. Actualmente se están realizando los estudios correspondientes para identificar la especie, los VOCs que produce y la potencialidad de ser utilizada en ensayos *in vivo* como posible estrategia de control del carbón del maní.