

## IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE HONGOS FITOPATÓGENOS DE FRESA POR PCR (ITS Y EF-1 $\alpha$ ) Y SUSCEPTIBILIDAD A BACTERIOCINAS DE *Bacillus thuringiensis*

Lafuente-Rincón DF<sup>a\*</sup>, Barboza-Corona JE<sup>b</sup>, Salcedo-Hernández R<sup>b</sup>, Abraham-Juárez R<sup>b</sup>, Valadez-Lira J.A.<sup>c</sup>, Quistián-Martínez D.<sup>c</sup>, De la Fuente-Salcido NM.<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Universidad Autónoma de Coahuila, Escuela de Ciencias Biológicas. Blvd. Torreón-Matamoros Km 7.5, Ciudad Universitaria Campus Torreón, Coahuila., 27104 México.

<sup>b</sup>Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca, División Ciencias de la Vida, Departamento de Alimentos, Irapuato, Guanajuato, 36500, México.

<sup>c</sup>Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Botánica, Av. Universidad s/n, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, 66451, México.

\*davidlaff@hotmail.com

### RESUMEN

La generación de resistencias a fungicidas de algunos hongos residentes del suelo representa un riesgo biológico en la producción de fresa por lo que su identificación permite mejores medidas de control alternas a pesticidas químicos como algunos péptidos de origen bacteriano. Se amplificaron por PCR las secuencias ITS y EF-1 $\alpha$  de 14 hongos aislados de muestras de suelo pertenecientes a una huerta dedicada al cultivo de fresa, los cuales fueron identificados por sus características morfológicas dentro de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium* y *Trichoderma*. El análisis de las secuencias permitieron la identificación de las especies *A. Niger*, *A. calidoustus*, *F. oxysporum*, *F. verticillioides*, *F. sporotrichioides*, *M. circinelloides*, *N. fischeri*, *P. menonorum*, *P. pinophilium* y *T. asperellum*, comprobando previamente su patogenicidad en fresa. Se determinó la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas Morricina, Kurstacina, Kenyacina, Entomocina, Tolworthcina producidas por *B. thuringiensis* mediante bioensayos de inhibición en pozos y medio líquido corroborando su daño celular por microscopía de fluorescencia. Las 5 bacteriocinas ejercen una actividad inhibitoria sobre todos los aislados del género *Fusarium* y *M. circinelloides* evitando la esporulación e inhibiendo su crecimiento comprobando su potencial capacidad como agentes antifúngicos en el biocontrol de hongos en fresa.

### ABSTRACT

Fungicides resistance of some soil fungi residents represent a biohazard strawberry production and its identification allows better control measures a chemical pesticides as some bacterial peptides. The ITS and EF-1 $\alpha$  sequences are amplified by PCR in 14 isolate fungi in soil samples belong to a strawberry orchard. Which were identified by their morphological characteristics within the genera *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium* and *Trichoderma*. Sequence analysis allowed to identify of fungal species *A. niger*, *A. calidoustus*, *F. oxysporum*, *F. verticilloides*, *F. sporotrichioides*, *M. circinelloides*, *N. fischeri*, *P. menonorum*, *P. pinophilium* and *T. asperellum* and previously checking their pathogenicity on strawberry. The antimicrobial activity of the Morricin, Kurstacin, Kenyacin, Entomocin, Tolworthcin bacteriocins produced by *B. thuringiensis* inhibition bioassay wells and cell liquid medium corroborating its fluorescence microscopic damage was determined. 5 bacterocins exert inhibitory activity on all *Fusarium* isolates and *M. circinelloides* preventing and inhibiting its growth sporulation proving its potential as antifungal agents in the biocontrol fungi in strawberry.

**Palabras clave:** Bacteriocinas, hongos, PCR.

**Área:** Frutas y Hortalizas.

## INTRODUCCIÓN

La producción de Fresa se ha visto comprometida por contaminaciones microbianas causantes de enfermedades en planta y fruto (Hancock *et al.*, 2008). Mundialmente las contaminaciones con hongos (*Fusarium sp.*, *Rhizoctonia sp.*, *Verticillium sp.*, y *Phytophthora sp.*) causantes de la “secadera” y otras enfermedades coronarias y de raíz asociadas a *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia* representan graves problemas para la producción de fresa (*Fragaria ananassa Duchesne*) generando grandes pérdidas económicas a los productores (Fang *et al.*, 2011). Esta problemática varía en la incidencia, control y/o tratamiento de las enfermedades, provocando una identificación imprecisa de hongos fitopatógenos y una pobre información sobre el rol ecológico de cada especie y su impacto ambiental (Rebollar-Alviter y Nita 2011). La identificación preliminar de fitopatógenos basada en estudios taxonómicos de los hongos y su patología sobre hospedero (Aoki *et al.*, 2005), requiere tiempo y experiencia considerables, sin embargo, los métodos moleculares como PCR agilizan la identificación analizando regiones específicas dentro de genes. Las secuencias de espaciadores transcritos internos (ITS) y regiones como el factor de elongación 1-alfa (TEF 1- $\alpha$ ) son las más utilizadas en la identificación, como código de barras estándar para hongos (Fernández-Orduño *et al.*, 2010), y una vez identificados ejercer medidas para controlar su proliferación.

Se ha considerado el uso de péptidos como sustitutos de antibióticos y plaguicidas convencionales (Keymanesh *et al.*, 2009). Ejemplos de estos péptidos incluyen las bacteriocinas de *B. thuringiensis* (Morricina 269, Kurstacina 287, Kenyiacina 404, Entomocina 420, Tolworthcina 524) (Barboza-Corona *et al.*, 2007), que presentan un amplio espectro de actividad antimicrobiana (De la Fuente-Salcido *et al.*, 2008), lo que les permite ser consideradas en el área de biocontrol de hongos fitopatógenos en cultivos como la fresa (Barboza-Corona *et al.*, 2012).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Identificación molecular de hongos fitopatógenos.

Se aislaron e identificaron morfológicamente, hongos de suelo cultivado con fresa de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium* y *Trichoderma*. La identificación molecular se basó en la amplificación de las secuencias de rDNA de ITS1, ITS2 y 5.8 rDNA, amplificadas mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en un termociclador (MyCycler™ ThermalCycler 170-9701. Biorad) usando los oligonucleótidos ITS1 e ITS4 (White *et al.*, 1990). Cada reacción de PCR contiene 60ng de ADN genómico, 5ng de cada oligonucleótido, 15 $\mu$ L de Taq &Go™ Master Mix (MP) siendo la reacción de volumen final de 50 $\mu$ L con los siguientes parámetros para PCR: 94°C por 5 min, 35 ciclos de 94°C por 5 min, 53°C por 1 min, 72°C por 1 min y un ciclo final de 72°C por 5 min. Las secuencias del transcrito de EF-1 $\alpha$  fueron amplificadas parcialmente usando los oligonucleótidos

EF1 (O'Donell *et al.*, 1998) y 1597R (Rehner and Buckley 2005). En cada reacción de PCR se utilizó 20ng de ADN genómico, 5ng de cada oligo, 15µL de Taq &Go™ Master Mix (MP) a un volumen final de 50µL. Los parámetros para PCR fueron 94°C por 5 min, 35 ciclos de 94°C por 5 min, 60°C por 1 min, 72°C por 15min y un ciclo final de 72°C por 5 min. Las regiones amplificadas fueron purificadas con un kit comercial (Promega) y secuenciadas en el Instituto de Biotecnología (IBT-UNAM) en Cuernavaca, México. Las secuencias se editaron con el software BioEdit y se compararon para determinar su identidad al compararlas con todas las secuencias nucleotídicas de hongos reportados de la base de datos del National Center Biotechnology Information (NCBI) empleando la herramienta BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

## **DETERMINACIÓN IN VITRO EL EFECTO DE LAS BACTERIOCINAS CONTRA HONGOS FITOPATÓGENOS.**

Las bacteriocinas de *B. thuringiensis* producidas de acuerdo a Barboza-Corona *et al.*, (2007) se utilizaron para determinar in vitro la actividad antimicrobiana contra los hongos aislados. Se utilizó la prueba de difusión en pozos, depositando 100 µL de cada bacteriocina en pocillos de 8 mm de diámetro en placas de agar papa y dextrosa (PDA) inoculadas con micelios de 7 días de crecimiento y realizando un control sin bacteriocinas. Se observó el efecto sobre las características morfológicas coloniales y daño a estructuras celulares a través de microscopia de contraste de fases con el microscopio Axio Imager A1, Carl Zeiss. También se trataron  $1 \times 10^5$  conidias/mL de los aislados de *F. oxysporum*, *F. sporotrichioides* y *F. verticillioides* con soluciones de bacteriocinas al 0.0, 1.0, 5.0 y 10% en 200µL de medio sabouraud en placa de microtitulación de 96 pozos. Los tratamientos fueron incubados por 24 horas a 30°C y se midió la densidad óptica con un detector multimodo (DTX 880 Beckman Coulter's Biomek®) para microplaca a  $\lambda=570\text{nm}$ . Además, se observó el efecto de las bacteriocinas sobre la permeabilidad celular de hongos exponiendo una suspensión de conidias de *Fusarium oxysporum* ( $1 \times 10^5$  conidias/mL) a tres tratamientos con la bacteriocina tolworthcina ( $\pm 1.0$ , 5.0 y 10.0%) en medio Sabouraud (1 mL), incubándolos por 24 horas a  $28 \pm 2$  °C. Los tratamientos se lavaron 3 veces con Buffer de Fosfatos Salino (PBS) centrifugando a 7000 rpm durante 5 minutos y resuspendiendo el precipitado en 1mL de PBS. Cada tratamiento fue teñido con 1 µL de Ioduro de Propidio (50mg/mL), se incubaron por 5 minutos en oscuridad y se lavó con PBS. El daño celular fue observado en un microscopio de fluorescencia Microstar IV™ Reichert (40X). Adicionalmente se determinó la actividad quitinolítica de 6 bacteriocinas de *B. thuringiensis* (incluyendo TEN de *B. thuringiensis* subsp. *tenebriorinis*) por difusión en pozos en agar quitina preparado con medio mínimo M9 con quitina coloidal (0.4%), verificando la degradación o hidrólisis de la quitina alrededor de los pocillos que se llenaron con 100µL de cada bacteriocina y un control con la quitinasa ChiA74, incubando las cajas por 3 días a 37°C.

## **RESULTADOS**

### **Identificación molecular de hongos fitopatógenos.**

Las regiones amplificadas con los oligonucleótidos ITS1-ITS2 cuyo porcentaje de homología según alineamientos en la base de datos del NCBI-BLAST y la caracterización morfológica previa, permitieron identificar *A. calidoustus*, *A. niger*, *M. circinelloides*, *N. fischeri*, *P. menorum*, *P. pinophilum* y *Trichoderma asperellum*. Se confirmó la identificación de *Fusarium* mediante las secuencias parciales TEF 1- $\alpha$  del NCBI. La comparación entre características morfológicas de especies de *Fusarium* y su identidad con secuencias de ITS permitieron identificar a *F. oxysporum*, *F. verticillioides* y *F. sporotrichioides*, y las construcciones filogenéticas de las regiones ITS y TEF-1 $\alpha$  (Fig. 1) muestran una estrecha relación genética entre los aislados identificados como *F. verticillioides* y la telemórfica de *Gibberella moliniforme*, con una identidad del 99% en ITS y 97% en TEF-1 $\alpha$ .

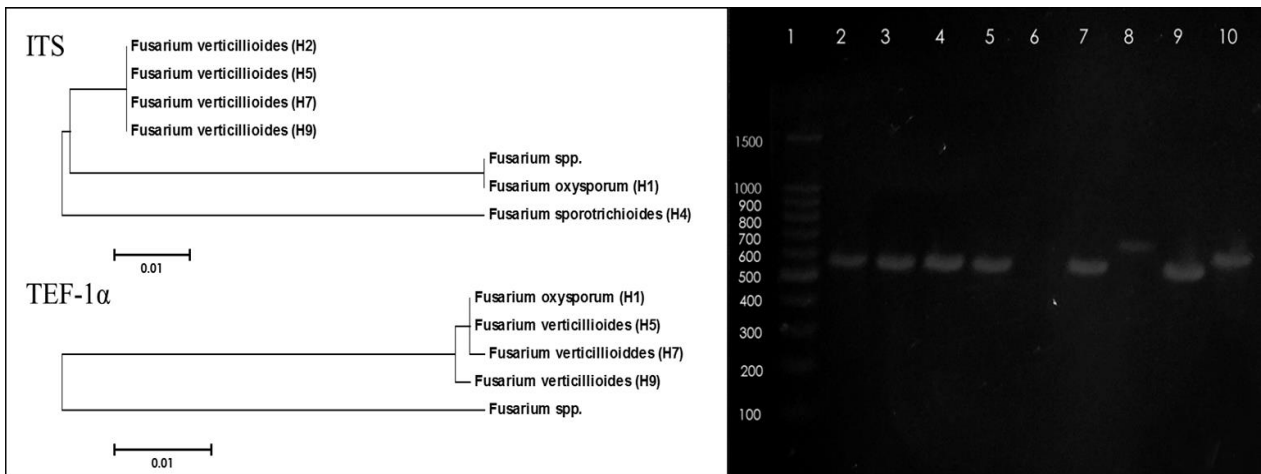


Figura 1. Identificación molecular de hongos fitopatógenos.

Construcción de árbol filogenético comparando las regiones amplificadas de ITS y TEF-1 $\alpha$  en *Fusarium*. La barra indica el número de sustituciones de bases como distancias filogenéticas, creados con el software MEGA 5.2 (Izda.)

Electroforesis en gel de agarosa 1% Sb1x de productos de PCR de la amplificación con primers específicos ITS1-ITS4 para la región 18s-5.8s-28s (550pb) de DNA. Carriles (Derecha): 1= Marcador molecular 1000pb; 2= *F. oxysporum* (H1); 3= *F. verticillioides* (H2); 4= *F. sporotrichioides* (H4); 5= *F. verticillioides* (H5); 6= *Mucor circinelloides* (H6); 7= *F. verticillioides* (H7); 8= *M. circinelloides* (H8); 9= *F. verticillioides* (H9); 10= *T. asperellum* (H10) (Dcha.)

### Determinación *in vitro* el efecto de las bacteriocinas contra hongos fitopatógenos.

Todas las bacteriocinas mostraron un efecto inhibitorio del crecimiento de los hongos identificado por cambios de color, densidad del micelio y esporulación alrededor de los pocillos, resultando efectivas contra un 56% de los aislados. Destacó el efecto de las bacteriocinas contra *Fusarium* el género más abundante, *Mucor* y *N. Fischeri*, y un efecto mínimo en el resto de los hongos. Además las bacteriocinas inhibieron el crecimiento de *F. oxysporum*, *F. sporotrichioides* y *F. verticillioides* a concentraciones de 1.00% y 5.00% con la mayoría de las bacteriocinas, Entomocina 420 en *F. verticillioides* causó mayor

efecto inhibitorio en las tres concentraciones probadas (Figura 2). Se observó que las bacteriocinas actúan sobre la permeabilidad celular de *F. oxysporum* observando daños en esporas e hifas teñidas con Ioduro de propidio, un colorante fluorescente capaz de penetrar en células con daños en la membrana plasmática emitiendo una señal fluorescente roja cuando interacciona con el DNA. Además ninguna de las bacteriocinas presentó actividad quitinolítica.

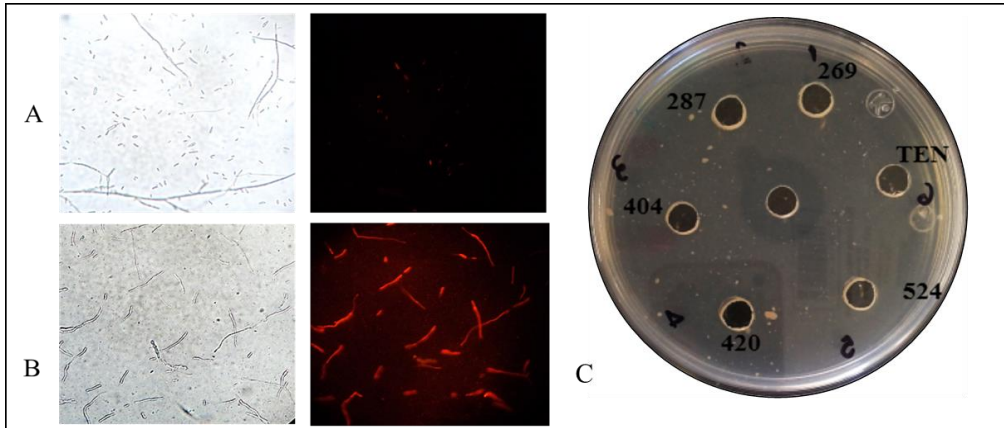


Figura 2. Efecto de bacteriocinas sobre pared celular de hongos.

A. Conidias de *F. oxysporum* sin exposición a bacteriocinas. B. Conidias de *F. oxysporum* expuesta a tolworthicina 524. Células teñidas de rojo indican daños en la integridad de membrana que permite la permeabilidad del Ioduro de propidio que en interacción con ácidos nucleicos genera una señal fluorescente. C. Determinación de actividad de Quitinasas de las bacteriocinas Morricina 269, Kurstacina 287, Kenyacina 404, Entomocina 420, Tolworthicina 524 y TEN. Pozo central quitinasa ChiA74 (Control positivo).

## DISCUSIÓN

Se determinó la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas Morricina, Kurstacina, Kenyacina, Entomocina, Tolworthicina producidas por *B. thuringiensis* mediante bioensayos de inhibición en pozos y medio líquido corroborando su daño celular por microscopia de fluorescencia. Las bacteriocinas ejercen una actividad inhibitoria sobre todos los aislados del género *Fusarium* y *M. circinelloides* evitando la esporulación e inhibiendo su crecimiento. Los resultados obtenidos confirman el potencial de las bacteriocinas de *B. thuringiensis* como agentes antifúngicos en el biocontrol de hongos fitopatógenos de fresa.

## BIBLIOGRAFIA

Aoki T., O'Donnell K., Scandiani M.M., 2005. Sudden death syndrome of soybean in South America is caused by four species of *Fusarium*: *Fusarium brasiliense* sp. Nov., *F. cuneirostrum* sp. Nov., *F. tucumaniae*, and *F. virguliforme*. Mycoscience. 46: 162-183.

Barboza-Corona, J.E., Vásquez-Acosta, H., Bideshi, D.K., Salcedo-Hernández, R. 2007. Bacteriocin-like inhibitor substances produced by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis*. Archives of Microbiology 187: 117-126.

- Barboza-Corona, J.E., De la Fuente-Salcido, N.M., Leon, M.F. 2012. Future Challenges and Prospects of *Bacillus thuringiensis*. En: *Bacillus Thuringiensis Biotechnology*, E. Sansinenea (Ed.) 367-381.
- De La Fuente-Salcido, N.M., Alanís, G., Bideshi, D. Salcedo-Hernandez, R., Bautista M., Barboza-Corona, J.E. 2008. Enhanced synthesis and antimicrobial activities of bacteriocin produced by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis*. *Archives of Microbiology* 190: 633-640.
- Fang X.L., Philips D., Li H., Sivasithamparam K., Barbetti M.J. 2011. Severity of crown and root diseases of strawberry and associated fungal and oomycete pathogens in West Australia. *Australasian Plant Pathol.* 40:109-119
- Fernández-Ortuño Dolores, Loza-Reyes E, Atkins S, Fraaije B. 2010. The CYP51C gene, a reliable marker to resolve interspecific phylogenetic relationships within the *Fusarium* species complex and a novel target for species-specific PCR. *International Journal of Food Microbiology.* 144:301-309.
- Hancock, J.F., Sjulín T.M., Lobos, G.A. 2008. Strawberries In: *Temperate Fruit Crop Breeding*. J.F. Hancock (Ed). Springer Science+Business Media B.V.
- Keymanesh K., Soltani S., Sardari S. 2009. *World Journal Microbiology Biotechnology.* 25: 933-944
- Kvas M., Marasas W.F., Wingfield B.D., Wingfield M.J., Steenkamp E.T. 2009. Diversity and evolution of *Fusarium* species in the *Gibberella fujikuroi* complex. *Fungal Diversity.* 34: 1-21.
- O'Donnell K., Kistler H.C., Cigelnik E., Ploetz R.C. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Applied Biological Sciences* vol 95: 2044-2049.
- Ochoa, J.L., Hernández, L.G., Latisnere, H., León, J.L., Larralde, C.P. 2007. Aislamiento e Identificación de Hongos Patógenos de Naranja Citrus Sinensis L. Osbeck cultivada en Baja California Sur, México. *Ciencia y Tecnología Alimentaría.* 5(5): 352-359.
- Rebollar-Alviter A., Nita M. 2011. *Optimizing Fungicide Applications for Plant Disease Management: Case studies on Strawberry and Grape. Fungicides-Beneficial and Harmful Aspects.* Thajuddin N (Ed), ISBN: 978-953-307-451-1
- Rehner S.A., Buckley E. 2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and *ETS*-alpha sequences: evidences for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia.* 91(1): 84-98
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, eds. Innis, MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. Academic Press, Inc., New York, pp. 315-322.