

## **Identificación de patógenos de fresa y búsqueda de alternativas biológicas para su control**

### **Identification of strawberry pathogens and search for biological alternatives for their control**

Gretel Clara Campos-Torres<sup>1</sup>, Omar Said Juárez-Becerril<sup>1</sup>, Karla Adriana-Tejeda Torres<sup>2</sup>, Francisco Vargas-Gasca<sup>1</sup> & Vianey Olmedo-Monfil<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biología, <sup>2</sup>Departamento de Farmacia; DCNyE Campus Guanajuato. Universidad de Guanajuato  
\*vg.olmedo@ugto.mx

### **Resumen**

La fresa es uno de los productos agrícolas más importantes de México, siendo el tercer proveedor a nivel mundial. Sin embargo, los cultivos de esta planta son susceptibles a los microorganismos patógenos como son bacterias, virus y hongos. Entre los hongos fitopatógenos se suelen encontrar los géneros *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Verticillium* y *Rhizoctonia*, que por lo general conducen a la pudrición y necrosis de las raíces. Para poder establecer el manejo y la prevención adecuada de las enfermedades ocasionadas por estos fitopatógenos es importante hacer la identificación del hongo causante de enfermedad en un cultivo determinado. El objetivo de nuestro trabajo fue la identificación de dos hongos candidatos a fitopatógenos, aislados a partir de plantas de fresa, provenientes de una zona de cultivo en el estado de Guanajuato, que exhibían síntomas notorios de enfermedad. Analizamos las características morfológicas coloniales y de las estructuras reproductivas de estos hongos, además de llevar a cabo un análisis molecular de regiones genómicas altamente conservadas, con lo que pudimos determinar que los hongos aislados corresponden al género *Fusarium* spp y *Macrophomina* spp. Ambos géneros han sido reportados anteriormente como fitopatógenos. Con ellos se realizaron pruebas preliminares *in vitro* de control biológico, lo cual nos permitirá proponer posibles formas de prevención y tratamiento de enfermedades en el cultivo de fresa.

**Palabras clave:** Fresa, Fitopatógeno, *Fusarium* spp, *Macrophomina* spp., Biocontrol.

### **Introducción**

De la producción mundial total de frutos rojos, la fresa representa un 62%. México se ubica como el tercer proveedor de fresa fresca en el mercado internacional, con el 14.83% del valor de las exportaciones mundiales y para el 2030, se espera un incremento acumulado del 34.44% para el mercado internacional y de un 26.44% en el mercado nacional (Secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación [SAGARPA], 2017). El cultivo de fresa sobresale por su consumo en fresco, así como materia prima para mermeladas y otros productos dulces. Aún cuando el cultivo tiene una alta tasa de producción, ésta se ve comprometida por la presencia de diversos microorganismos causantes de enfermedades en la planta y en el fruto, destacando aquellas causadas por hongos (Hassan & Chang., 2022).



Figura 1. Comparación de plantas enferma (derecha) y sana (izquierda)

Como ejemplo, podemos mencionar la mancha foliar causada por *Alternaria alternata*, la antracnosis causada por *Colletotrichum fragariae*, la pudrición negra de las raíces causada por varias especies como son *Fusarium*, *Verticillium*, *Rhizoctonia*, entre muchas otras (Lafuente Rincón *et al.*, 2015). La forma habitual de tratar estas enfermedades es mediante el uso de compuestos antifúngicos, que suelen tener impacto negativo en la salud humana, además de contaminar el suelo (Hancock *et al.*, 2008). Adicionalmente, cada vez hay una mayor demanda de productos agrícolas libres de plaguicidas. En este sentido, la implementación de tratamientos a base de biocontroladores representa una estrategia importante para enfrentar a los hongos fitopatógenos (Tariqjaveed *et al.*, 2021).

Los hongos del género *Trichoderma* spp. son usados como agentes de control biológico, ya que tienen la capacidad de asociarse de manera benéfica con las plantas, en las que mejoran el crecimiento y la capacidad de defensa. Además, *Trichoderma* compite con los fitopatógenos por el espacio y nutrientes y es capaz de desplegar un comportamiento de ataque directo hacia los hongos fitopatógenos (Zeilinger & Omann, 2007). La identificación de los patógenos de un cultivo es fundamental para acceder a información relacionada con su ciclo reproductivo, formas de infección y producción de estructuras de supervivencia, además de permitir el análisis de su posible control.

Una de las formas de identificar hongos es por medio del estudio de los rasgos fenotípicos macroscópicos coloniales y microscópicos del micelio y estructuras reproductivas, lo cual requiere experiencia y tiempo para definir la morfología y fisiología de cada género y la precisión en la identificación no suele ser alta (Sanpietro *et al.*, 2010). Por esta razón se recurre a técnicas más sensibles que se basan en características moleculares enfocadas al análisis de regiones genómicas altamente conservadas entre especies, como son los espaciadores internos que se transcriben (ITS) en los genes ribosomales 18S, 5.8S y 28S. El método de identificación hace uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la cual se basa en la capacidad que tiene la DNA polimerasa para extender un par de oligonucleótidos sintéticos, que hibridan de manera específica sobre el DNA molde, amplificando secuencias de DNA específicas del organismo en estudio. Los productos amplificados son secuenciados y se obtiene lo que se considera un código de barras que puede compararse con las bases de datos disponibles, permitiendo una identificación más precisa del organismo de interés (Ridgwell, 2004).

El objetivo de nuestro trabajo fue identificar dos hongos, posibles fitopatógenos, aislados de plantas de fresa, colectadas de un campo de cultivo en el estado de Guanajuato, que presentaban síntomas de enfermedad, con la finalidad, a mediano plazo, de buscar posibles formas de prevención y tratamiento de enfermedades en el cultivo de fresa.

## Metodología

- Cultivo de los hongos a identificar

En el laboratorio se nos proporcionaron dos hongos referenciados como “Patógeno 1” y “Patógeno 2” los cuales fueron aislados de plantas de fresa visiblemente enfermas. Ambos hongos fueron sembrados en placas con medio Agar-Papa-Dextrosa (PDA) e incubados a 28°C. Se tomaron fotografías de los cultivos en placa, así como del micelio y de las estructuras reproductivas. Para poder colectar micelio, se colocó una membrana de celofán, previamente esterilizada sobre el medio de cultivo antes de inocular cada hongo.

- Extracción de DNA genómico

Se colectaron las muestras de los cultivos en PDA, usando un bisturí para raspar el micelio de las cajas de medio PDA con celofán, colocándolo en un tubo eppendorf de 1.5mL y congelando inmediatamente en nitrógeno líquido. Posteriormente, se molieron las muestras con una barrilla esmerilada hasta obtener un polvo fino, al cual se le añadieron 500 µL de buffer de lisis (Urea 42% p/v, EDTA [0.02M], NaCl [0.3M], Tris-HCl pH 8.0 [0.05M], Sarcosina 1% p/v), mezclando perfectamente. Posteriormente, se agregaron 500 µL de fenol-cloroformo y se mezcló vigorosamente, usando un vórtex. Las muestras fueron centrifugadas a 12000 revoluciones por minuto (rpm), durante cinco minutos a una temperatura de 4°C, para separar una fase acuosa, conteniendo el DNA, de la fase orgánica del fenol-cloroformo. La fase acuosa se transfirió a un tubo eppendorf nuevo, al cual se le añadió 1 mL de etanol absoluto, frío. Se centrifugaron nuevamente las muestras a 12000 rpm durante un minuto, 4°C. Se eliminó el sobrenadante del tubo y la pastilla obtenida fue lavada dos veces con etanol al 70%, centrifugando entre cada lavado. La pastilla, conteniendo el DNA, se dejó secar y se resuspendió en 20 µL de agua destilada.

Para comprobar la calidad del DNA genómico extraído se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%, en buffer TAE. Se cargaron 3 µL de las muestras de DNA genómico y se corrieron durante 45 minutos a 80 Volts, se cargó en uno de los carriles 1 µL de marcador de peso molecular.

- Diagnóstico e identificación molecular

Se colectaron las muestras de los cultivos en PDA, usando un bisturí para raspar el micelio de las cajas de Las muestras de DNA (20ng/ µL) se enviaron al laboratorio LabSerGen (laboratorios de servicios genómicos, Langebio CINESTAV) para la amplificación por PCR de las regiones ITS y la posterior secuenciación y comparación con las bases de datos.

- Pruebas de antagonismo *in vitro*

Para estudiar si algunas de las cepas de *Trichoderma spp* con las que contamos en el laboratorio son capaces de limitar el crecimiento de los hongos aislados se llevaron a cabo cultivos cuales del biocontrolador *Trichoderma atroviride* IMI 206040 y una cepa modificada genéticamente que produce mayor cantidad de la proteína de unión a quitina Tal6 (Romero-Contreras *et al.*, 2019). Cada hongo se inoculó en extremos opuestos de las placas y se incubaron a 28°C, haciendo registro del crecimiento cada 24h hasta los 8 días.

## Resultados

De los cultivos de cada hongo aislado pudimos analizar el crecimiento colonial en las placas de PDA, así como las hifas y el micelio de los mismos. En la figura 1, se pueden observar las placas de cada uno de los hongos, así como un acercamiento al micelio y de sus estructuras reproductivas. Para el caso del aislado referenciado como patógeno 1 las colonias mostraron crecimiento rápido, micelio de color crema, algodónoso, con pigmentación rosa en el medio de cultivo. Las hifas son delgadas, con forma irregular, septadas, con ramificaciones varias, con múltiples puntos de origen. En cuanto a la estructura reproductiva, las conidias se presentan delgadas, multiseptadas y con ápices en forma de gancho. En cuanto aislado referenciado como patógeno 2, el crecimiento micelial fue denso, de color grisáceo a negro, presentando hifas con paredes delgadas, septadas, las cuales se ramifican en ángulos rectos a partir de las hifas parentales con contracción en el punto de origen. Este patógeno presenta como estructura reproductiva microesclerocios los cuales son masas compactas de micelio fúngico endurecido, esférico, ovalado de color marrón en fase joven que se oscurece con el envejecimiento.

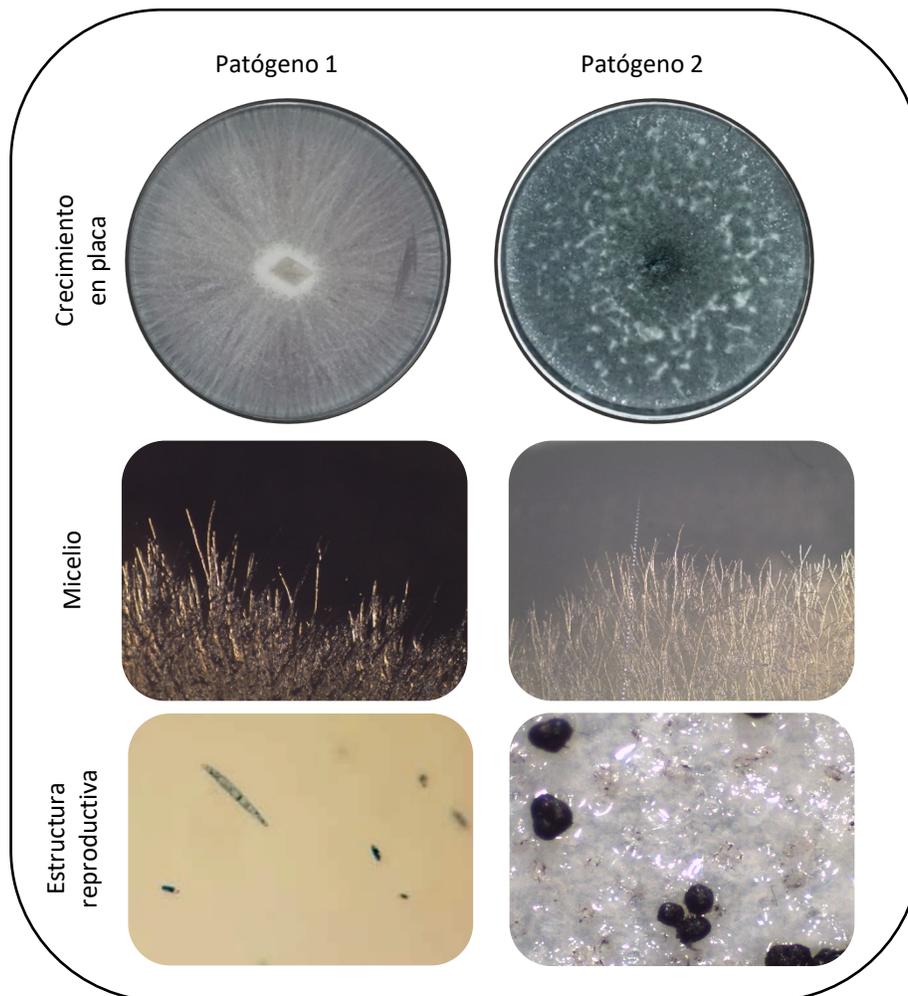


Figura 2. Morfología colonial y micelial de los hongos aislados de plantas de fresa

Cada hongo fue cultivado en medio sólido y se extrajo DNA genómico. En la figura 3A se observan los resultados obtenidos después de realizar la electroforesis en gel de agarosa de las muestras de ADN genómico de cada uno de los hongos aislados, con el fin de evaluar la calidad de la extracción y la integridad de las muestras. En cada caso, se obtuvo una única banda de alto peso molecular, correspondiente al ADN genómico, libre de RNA y de otros posibles contaminantes, lo que indica buena integridad de las muestras.

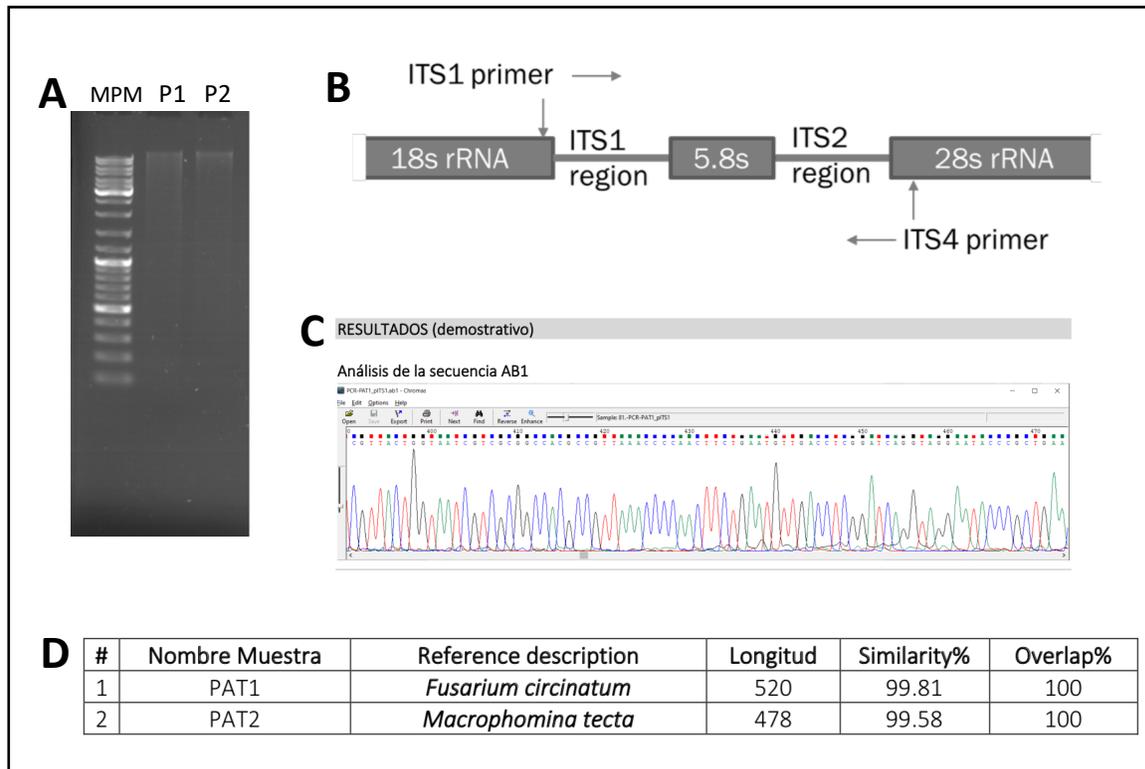


Figura 3. Análisis molecular de los hongos aislados de plantas de fresa enfermas. A) Electroforesis en gel de agarosa del DNA genómico de patógeno 1 y patógeno 2., con un marcador de peso molecular B) esquema representativo de las regiones analizadas mostrando la ubicación de los iniciadores para el PCR. C) Esquema mostrando una secuencia demostrativa del producto obtenido. D) Identificación de las muestras analizadas.

Adicionalmente, se muestra en la figura 3B la región donde alinean los iniciadores y la dirección de la amplificación. Con esas reacciones se obtuvo un producto que fue secuenciado por el método de Sanger y se muestra en la figura 3C una imagen demostrativa del resultado obtenido. En la figura 3D se muestra la identificación de cada uno de los aislados. Se logró amplificar una región de 520pb para el Patógeno 1, con un porcentaje de identidad cercano al 100% y se indica que ese hongo corresponde al género *Fusarium*. Mientras que para el Patógeno 2 se secuenció un fragmento de 478pb con más del 99% de identidad y corresponde al género *Macrophomina*. Si bien, en el resultado obtenido se indica también la especie para cada uno de los aislados, este dato debe tomarse con reserva ya que sería necesario analizar más marcadores moleculares, adicionales a los ITS, para poder confirmar las especies propuestas. Las observaciones macroscópicas coinciden con los géneros identificados, según las características reportadas para estos dos géneros de hongos fitopatógenos (Hafizi *et al.*, 2014; Márquez *et al.*, 2021)

Finalmente, en las confrontaciones entre *Fusarium spp* y *Macrophomina spp* con dos cepas de *T. atroviride*, logramos observar una actividad antagónica ligeramente mayor por parte de la cepa sobreexpresante de Tal6, como se puede observar en la figura 4, ya que, en ambos casos, desde el quinto día y hasta el octavo día de registro, esta cepa restringió en mayor proporción el crecimiento tanto de *Fusarium spp.*, como de *Macrophomina spp*. Es importante realizar las confrontaciones con más cepas disponibles, con la finalidad de encontrar alguna que pueda inhibir el crecimiento de los patógenos identificados, además de realizar pruebas donde se incluyan las plantas de fresa, para evaluar el grado de protección que puede conferir el agente de control biológico *Trichoderma spp*.

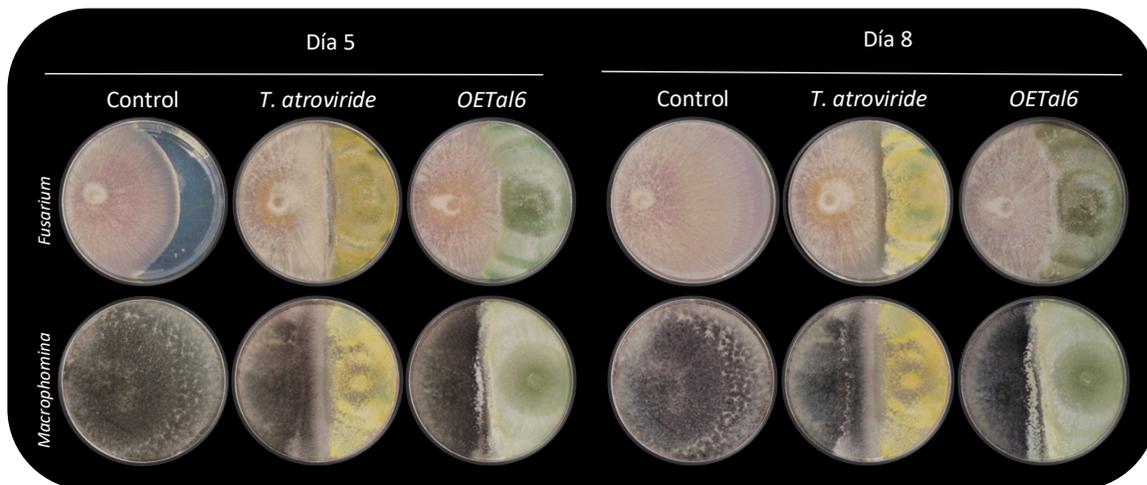


Figura 4. Pruebas de antagonismo in vitro de *Fusarium spp.* y *Macrophomina spp.* contra *Trichoderma atroviride* y *OETa6*

## Conclusiones

Se realizó la identificación de los hongos *Fusarium spp.* y *Macrophomina spp.* como posibles causantes de enfermedad en plantas de fresa en el estado de Guanajuato. Logramos observar antagonismo por parte de *T. atroviride* sobre ambos fitopatógenos, siendo más eficiente la cepa *OETa6*. Este trabajo representa una propuesta adicional para mejorar la protección del cultivo de fresa, contra los patógenos presentes en la región, a través del uso de agentes de control biológico.

## Bibliografía/Referencias

- Hafizi R, Salleh B, Latiffah Z. Morphological and molecular characterization of *Fusarium. solani* and *F. oxysporum* associated with crown disease of oil palm (2014). *Braz J Microbiol.* doi: 10.1590/s1517-83822013000300047.
- Hancock J.F., Sjulín T.M., Lobos G.A. 2008. Strawberries. En: *Temperate Fruit Crop Breeding*. J.F. Hancock (Ed). Springer, Science+Business Media B.V. 393-437- [http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4020-6907-9\\_13](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4020-6907-9_13).
- Hassan O, Chang T (2022). Morphological and molecular characteristics of fungal species associated with crown rot of strawberry in South Korea. *Mol Biol Rep.* doi: 10.1007/s11033-021-06841-9
- Lafuente Rincón, D. F. L. R., Hernández Terán, F. H. T., & De la Fuente-Salcido, N. M. D. F. S. (2015) Importancia de la Detección y Control Oportunos de Hongos Fitopatógenos en Fresa (*Fragaria spp.*). *Acta Química Mexicana*. AMQ. Recuperado 11 de julio de 2023, de <http://www.actaquimicamexicana.uadec.mx/?p=175>
- Márquez N, Giachero ML, Declerck S and Ducasse DA (2021) *Macrophomina phaseolina*: General Characteristics of Pathogenicity and Methods of Control. *Front. Plant Sci.* 12:634397. doi: 10.3389/fpls.2021.634397
- Ridgwell K. (2004). Genetics tools: PCR and sequencing. *Vox sanguinis*, 87 Suppl1, 6–12. <https://doi.org/10.1111/j.1741-6892.2004.00421.x>
- Romero-Contreras YJ, Ramírez-Valdespino CA, Guzmán-Guzmán P, Macías-Segoviano JI, Villagómez-Castro JC, Olmedo-Monfil V. (2019) Tal6 from *Trichoderma atroviride* es a LysM effector involved in mycoparasitism and plant association. *Front Microbiol.* 10:2231. doi: 10.3389/fmicb.2019.02231.
- Sampietro DA, Marín P, Iglesias J, Presello DA, Vattuone MA, Catalan CA, Gonzalez Jaen MT (2010). A molecular based strategy for rapid diagnosis of toxigenic *Fusarium* species associated to cereal grains from Argentina. *Fungal Biol.* doi: 10.1016/j.mycres.2009.10.008.

- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (2017). Planeación Agrícola Nacional 2017-2030. Recuperado el 11 de julio del 2023 de: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257075/Potencial-Fresa.pdf>
- Tariqjaveed, M., Farooq, T., Al-Hazmi, A. S., Hussain, M. M., & Rehman, A. U. (2021). Role of *Trichoderma* as a biocontrol agent (BCA) of phytoparasitic nematodes and plant growth inducer. *J Inv Pathol*, 183, 107626. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2021.107626>
- Zeilinger, S., & Omann, M. (2007). *Trichoderma* biocontrol: signal transduction pathways involved in host sensing and mycoparasitism. *Gene regulation and systems biology*, 1, 227–234. <https://doi.org/10.4137/grsb.s397>.