



**CARACTERIZACION MOLECULAR MEDIANTE ITS DEL BIOCONTROLADOR
Paecilomyces sp. DEL BANCO DE CEPAS DE LA UNIVERSIDAD FRANCISCO DE
PAULA SANTANDER, SEDE CAMPOS ELISEOS – LOS PATIOS**

LILIANA YANETH SUÁREZ CONTRERAS¹
WENDY LORENA PEÑA BARRERA²

¹ MSc. en Biología énfasis Genética. Facultad de Ciencias Agrarias y del Ambiente, Universidad Francisco de Paula Santander. lilianayanethsc@ufps.edu.co

² Estudiante de pregrado en Ingeniería Biotecnológica. Facultad de Ciencias Agrarias y del Ambiente, Universidad Francisco de Paula Santander. lorenapb@outlook.com.

RESUMEN

Con el fin de caracterizar molecularmente 14 cepas aisladas de diferentes municipios de Norte de Santander de *Paecilomyces sp.* conservadas en el Banco de Cepas de la Facultad de Ciencias Agrarias y del Ambiente, se estandarizó un protocolo para su identificación molecular mediante ITS para hongos, utilizando el siguiente programa en el termociclador: 94 °C por 5 minutos para la desnaturalización inicial, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C para la desnaturalización, 58 °C por 1 minuto para el anillamiento y 72 °C por 1 minuto para la extensión; finalizando con una elongación de 72°C por 10 minutos. La reacción se llevó a cabo con un volumen final de 25 µL que contenía: 1 µL de ADN, 16,65 µL de agua nanopura, 0,75 µL de MgCl₂ (1,5 mM), 2,5 µL de Buffer (1X), 1,25 µL de ITS 4(0.5 mM), 1,25 µL de ITS 5(0.5 mM), 0,1 µL de *Taq polimerasa*, y 0,5 µL de DNTP's (0.2 mM). El producto de los amplicones obtenidos fue verificado en electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio y comparados con el marcador molecular de 1 Kb. Los fragmentos ITS generados fueron enviados al laboratorio Corpogen para ser secuenciados y los resultados fueron comparados con las secuencias reportadas en el banco de genes (NCBI) utilizando BLAST y RDP sequence match donde se identificó a GIAV3, HC002 y HZ002 como pertenecientes al género y especie *Purpureocillium lilacinus*, GIAV12 a *Penicillium copticola* y GIAV 14 a *Penicillium paxilli*.

Palabras claves: *Paecilomyces*, PCR, ITS, Caracterización molecular, control biológico.

1. INTRODUCCIÓN

El banco de cepas de la UFPS, sede Campos Elíseos, cuenta hasta ahora con 75 cepas de hongos, las cuales se han clasificado macroscópicamente y microscópicamente comparándolas con

la bibliografía para identificar correspondencia con un determinado género. La finalidad de este proyecto es la caracterización molecular de las cepas pertenecientes al género *Paecilomyces sp* presentes en el banco de cepas de la UFPS para ser utilizadas con certeza en



los proyectos de investigación como en docencia. El hongo *Paecilomyces* es un entomopatógeno que causa la enfermedad y posterior muerte en nematodos, por lo tanto es utilizado como un bionemático. También es considerado un excelente biocontrolador por su papel antagonista en los ensayos preliminares in vitro para control biológico de la moniliasis, enfermedad producida por el fitopatógeno *Moniliophthora roreri* que ataca el cacao, y produce pérdidas superiores al 50% de las cosechas al sector cacaotero, [1] por esta razón es muy importante su estudio.

Los marcadores moleculares utilizados para la identificación de estas cepas son ITS (espaciadores internos de transcritos), correspondientes al ADN_r, los cuales permiten estudiar las regiones de ADN_r polimórficas, pues son únicas para cada especie, lo que permitirá determinar si las cepas almacenadas en el Banco de Cepas corresponden con certeza al género asignado y así conocer su especie. A partir de los resultados obtenidos se logrará caracterizar e identificar molecularmente el hongo *Paecilomyces sp.* e igualmente permitirá estandarizar un protocolo de identificación molecular para aplicar estas técnicas a los otros géneros de hongos conservados en el banco de cepas de la Facultad de ciencias agrarias y del Ambiente de la UFPS.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Obtención y conservación de *Paecilomyces sp*

El estudio se desarrolló en el Laboratorio Biotecnología Molecular de la Universidad Francisco de Paula Santander e inicialmente se tomaron las veintidos (22) cepas existentes, rotuladas con diferentes códigos e identificadas según los mismos como

pertenecientes al género *Paecilomyces sp*, dichas cepas fueron aisladas en dos proyectos anteriores sobre control biológico[2][3]. Para la conservación se siguió el protocolo de desinfección descrito por Suárez (2004) [4], y se sembró en cajas de Petri con Agar Patata Dextrosa (PDA) Composición: 200 g de infusión de papa, 20 g de glucosa y 15 g de Agar-agar; se incubaron a 28°C bajo un monitoreo diario durante siete días; se hicieron repiques en este agar hasta obtener cultivos puros para la posterior siembra en Caldo Papa Dextrosa (PDB).

2.2 Caracterización microscópica de los aislamientos de *Paecilomyces*

Se preparó el cultivo de hongo en cámara húmeda utilizado en el Laboratorio de Sanidad vegetal, UFPS [5], que consiste en introducir en una caja Petri, un disco de papel filtro y una varilla en forma de "V", que soporta un portaobjetos que contiene un trozo de medio de cultivo estéril muy delgado (PDA) en el cual se inocula el hongo por punción, luego el papel filtro se humedece con 3 ml de agua estéril conservando la asepsia. La placa es incubada a 28°C durante ocho días. Después de este tiempo, se cubre la muestra con azul de lactofenol y se sitúa el cubreobjetos para observar al microscopio

2.3 Extracción del ADN de *Paecilomyces sp.*

Se siguió el protocolo de extracción de ADN de *Moniliophthora roreri* propuesto por Suárez (2005) [6]. Se tomó el micelio crecido previamente (0,5-0,75 g) en caldo papa dextrosa en un microtubo de 2ml y se le adicionó un volumen de 500 ml de buffer de extracción (50mM Tris-HCl pH= 7,5; 50 mM EDTA; 2% de SDS y 1% de Na₂SO₃). Se procedió a macerar la muestra con ayuda del rotor



durante 1 minuto; luego se agitó en vortex por un minuto y posteriormente se centrifugó a 6000 x g, por diez minutos; el sobrenadante se incubó a 70 °C durante quince minutos. Después, se adicionó un volumen fenol/cloroformo de (1:1) a cada muestra y se centrifugó a 10.000 x g, por diez minutos. Se transfirió la fase acuosa a otro microtubo y se le agregó un volumen de isopropanol. Se dejó en frío (congelación) 10 minutos, nuevamente se centrifugó a 10.000 x g, durante diez minutos, el precipitado se secó a 37°C, se resuspendió en 50ml de TE 1X pH=8 y se adicionó 1 ul de RNAsa a cada extracción.

2.4 Purificación y verificación del ADN de *Paecilomyces sp*

Para la purificación de las extracciones del ADN se utilizó etanol y fueron verificadas mediante electroforesis de acuerdo a Suárez (2005) en un gel de agarosa al 1% en solución de Buffer TBE 1X (Tris base PM 121.14, ácido bórico PM 61,84 y EDTA 0,5 M, pH 8,0). Para la preparación de la muestra, se tomó 8 ul del ADN extraído en un microtubo de 1ml y se agregó 2 ul de buffer de carga (compuesto por azul de bromofenol y xilencianol) para chequear la migración del ADN extraído en el gel de agarosa (Figura 6b) . Se mantuvo voltaje de 100 V durante 20 minutos durante la electroforesis, luego el gel se visualizó en el transiluminador de UV verificando la correcta extracción del ADN.

2.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) mediante iniciadores universales ITS 4 e ITS 5.

Se amplificó la región ITS mediante iniciadores universales, se utilizó el protocolo propuesto por Suárez (2013) [7] como sigue: La reacción de PCR fue llevada a cabo en tubos de 0,5 mL con un volumen final de 25 µL que contenían: 1 µL de ADN , 16,65 µL de agua

nanopura, 0,75 µL de MgCl₂ (1,5 mM), 2.5 µL de Buffer (1X), 1.25 µL de ITS 4(0.5 mM), 1.25 µL de ITS 5(0.5 mM), 0.1 µL de Taq polimerasa, 0.5 µL de DNTP's (0.2 mM). La reacción se llevó a cabo en un termociclador (CFX96™ TOUCH REAL-TIME PCR,) utilizando el siguiente programa: 94°C por 5 minutos para la desnaturalización inicial, seguido de 35 ciclos de 30 segundos 94 °C para la desnaturalización, 58 °C por 1 minuto para el anillamiento y 72 °C por 1 minuto para la extensión; finalizando con una elongación de 72°C por 10 minutos. Los amplicones fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1 % y se tiñó con bromuro de etidio.

2.6 Secuenciación de los fragmentos ITS y comparación de secuencias con bases de datos

Los amplicones ITS generados fueron enviados al laboratorio de Corpogen y Los resultados de la secuenciación de cada aislamiento se compararon con las reportadas en el NCBI utilizando BLAST y RDP sequence match (programas informáticos de alineamiento de secuencias). Comparando la secuencia problema con una gran cantidad de secuencias que se encuentren en la base de datos indicando el género de la especie a la que pertenece cada cepa.

3. RESULTADOS

3.1 Obtención y conservación de *Paecilomyces sp*

De 22 cepas de *Paecilomyces sp*. 14 se utilizaron en esta investigación (Tabla 1), 8 cepas no se lograron reactivar debido a la escases de medio PDA en el que estaban.



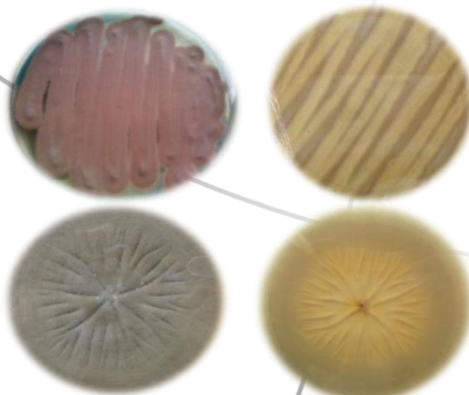
Tabla 1. Lista de cepas de *Paecilomyces* procedentes del Banco de Cepas, UFPS.

Cepas de <i>Paecilomyces</i> sp. Obtenidas de la UFPS		
NUMERO	CODIGO ANTIGUO	CODIGO NUEVO
1	HA010	GIAV2
2	HA011	GIAV3
3	HA012	GIAV8
4	HA013	GIAV9
5	HA014	GIAV12
6	HA015	GIAV13
7	HA016	GIAV14
8	HS021	HS021
9	HS022	HS022
10	HC002	HC002
11	HC003	HC003
12	HC004	HC004
13	HC006	HC006
14	HZ002	HZ002

Algunas cepas tenían dos códigos: un código antiguo y uno nuevo, en estos casos se estableció un solo código (código nuevo) para ambas cepas.

Una vez purificadas las cepas en PDA, presentaron diferencias morfológicas desde el color hasta la textura (Figura 1), categorizándolas en 2 grupos, con color rosa-grisáceo típico el grupo A y el verde- grisáceo propio del grupo B (Tabla 2).

Figura 1. Morfología macroscópica de los grupos de *Paecilomyces* sp. en PDA.



3.2 Caracterización microscópica de los aislamientos de *Paecilomyces* sp.

El hongo *Paecilomyces* sp. presentó en su morfología (Figura 2), conidióforos tabicados de paredes lisas y ramificados en sus extremos, con metulas cortas y fialides con el ápice puntiagudo, de donde nacen los conidios lisos o equinulados, tal como lo indican Arias E y Piñeros P, (2008) [8] formando largas cadenas, sin ramificar, con aspecto característico de pincel, según Barnett, H.L., and Hunter, B.B. (1999). [9].

Figura 2. Morfología microscópica de los aislamientos de *Paecilomyces* sp. microscopio 40X.

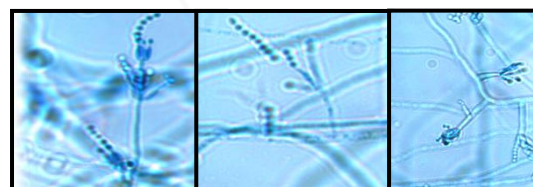


Tabla 2. Clasificación macroscópica de *Paecilomyces* según su morfología.

CODIGOS	FENOTIPO
GRUPO A.	Las colonias inicialmente son blancas, pero luego de estar esporuladas en agar PDA presentan un color rosa - grisáceo ; textura polvorienta, borde irregular y color de reverso beige.
HZ002,HC003,H C006,GIAV3,GIA V9,GIAV8, GIAV13,HS022, HC002, HC004, HS021 y GIAV2	
GRUPO B.	Las colonias inicialmente son blancas, pero luego de estar esporuladas en agar PDA presentan un color verde-grisáceo, textura polvorienta, borde irregular y color de reverso beige.
GIAV12 Y GIAV14	

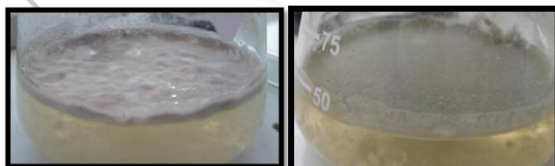
3.3 Extracción del ADN de *Paecilomyces* sp

Se sembró el hongo en caldo PDB, para obtener el micelio (Figura 3), y se procedió a la extracción del ADN. Se obtuvo aproximadamente entre 1 a 2 µg/µl de ADN a partir de esta extracción,



se escogieron las extracciones que presentaban mejor calidad y cantidad del ADN.

Figura 3. Micelio de *Paecilomyces sp.* en caldo PDB luego de 10 días de siembra. Izq. Micelio grupo A; Der. Micelio grupo B.



3.4 Purificación y verificación del ADN de *Paecilomyces sp*

Una vez corrida la electroforesis de las extracciones de ADN, se pudo visualizar una buena cantidad de ADN de las cepas a identificar, suficientes para realizar PCR (Figura 4).

Figura 4. Verificación de calidad de ADN, mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% de las extracciones de ADN.



3.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) mediante iniciadores universales ITS 4 e ITS 5.

Una vez seleccionadas las 14 extracciones de ADN de *Paecilomyces sp.*, se llevaron a cabo diferentes ensayos en el termociclador para obtener los amplicones. Inicialmente se probó con el protocolo propuesto por Suárez (2013). Teniendo como volumen final de cada muestra 25 μ l como se muestra en la (Tabla 3).

Tabla 3. Cantidades y concentración de reactivos para PCR de *Paecilomyces sp.*

Componentes	Concentración Stock	Concentración Final	Una muestra
Buffer	10x	1x	2.5 μ l
MgCl ₂	50 mM	1.5 mM	0.75 μ l
Cebador ITS4, ITS 1	10 M μ	0.5 μ M	1.25 μ l
Cebador ITS5, ITS 2	10 M μ	0.5 μ M	1.25 μ l
DNTPs	10 mM	0.2 mM	0.50 μ l
Taq polimerasa	5 U/ μ l	0.02 U/ μ l	0.10 μ l
Agua nanopura	-	-	16.65 μ l
Solución de DNA	5 ng/ μ l	0.4 ng/ μ l	1.0 μ l
Suero Fetal Bovino	-	-	1.0 μ l
Volumen final	-	-	25.0 μ l

Se inició con un ciclo de denaturación a 94°C por un minuto, 35 ciclos de 94°C por un minuto, el anillamiento 52°C por 45 segundos, la extensión 72 °C por 1 minuto y un ciclo final de 72°C por 7 minutos. En estos ensayos iniciales, no se obtuvieron amplicones para *Paecilomyces*, solo para *Moniliophthora roreri* (control positivo). Sin embargo, se variaron algunas temperaturas y tiempos de ciclos del termociclador para la PCR de acuerdo al protocolo de Martin (2013) [10], primero un ciclo de denaturación a 94°C por cinco minutos, 35 ciclos de 94°C por un minuto, el anillamiento 55°C por un minuto, la extensión 72 °C por 1 minuto y un ciclo final de 72°C por 10 minutos, y se obtuvieron amplicones para GIAV 14; posteriormente se modificó el protocolo utilizando la temperatura de anillamiento de 58°C propuesta por Perdomo H *et al.* (2011) [11], obteniendo los amplicones para HC002, HC003, HS021, HZ002, GIAV2, GIAV3, GIAV8, GIAV9, GIAV 12, GIAV13, GIAV 14 y el control positivo (*Moniliophthora roreri*). (Figura 5).



Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa de productos de amplificación con iniciadores universales a partir de ADN de *Paecilomyces sp.*



3.6 Secuenciación de los fragmentos ITS y comparación de secuencias con las bases de datos

Los resultados del análisis taxonómico de estas secuencias fue de aproximadamente 500 pb para HC002, HZ002, GIAV3. Según la base de datos del NCBI, indican que las secuencias tiene un 100% de identidad en el 100% de su longitud con secuencias de ITS pertenecientes a las especies *Purpureocillium lilacinum*. De acuerdo con la literatura, *Purpureocillium lilacinum* se denominaba anteriormente *Paecilomyces lilacinus*, pero después de una revisión taxonómica se clasificó en un nuevo género llamado *Purpureocillium* debido a varias diferencias fenotípicas con especies del género *Paecilomyces* según Luangsa-ard JJ, et al. (2011) [12]; por otra parte el resultado del análisis de la secuencia de GIAV12 identificó esta cepa como *Penicillium copticola*; en cuanto a GIAV14 fue caracterizada molecularmente como *Penicillium paxilli*.

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En este trabajo se purificaron y reactivaron 14 cepas de hongos aislados de diferentes municipios de Norte de Santander, conservadas en el Banco de Cepas de la UFPS-Patios. Se estandarizó la PCR utilizando los cebadores ITS4 y 5, con una temperatura

de anillamiento de 58°C. Y así se identificaron molecularmente cinco de las cepas, como *Purpureocillium lilacinum* (HC002, HZ002, GIAV3), *Penicillium copticola* (GIAV12) y *Penicillium paxilli* (GIAV14).

Los resultados obtenidos son relevantes, ya que *Purpureocillium lilacinum* es considerado de gran interés para el control biológico de enfermedades de acuerdo a los ensayos de antagonismo in vitro con *M. royeri*.

REFERENCIAS

- [1] GRISALES, S.; y AFANADOR, L. Análisis de la variabilidad genética en *Moniliophthora roreri* con AP-PCR y RADP En Antioquia, Colombia. Revista Colombiana de Biotecnología.9 (2):15 - 32. 2007.
- [2] SUÁREZ, L. Y RANGEL A. Aislamiento de microorganismos para control biológico de *Moniliophthora roreri*. Acta Agronómica. 2013.
- [3] FIGUEROA, Wilmer; RAMIREZ, Jesús; SIGARROA, Alina. Efecto de las cepas nativas *Paecilomyces sp.* (Bainier) y *Lecanicillium sp.* (Zimm) en el control de *Carmenta foraseminis Eichlin* (Lepidoptera: Sesiidae) en cultivos de cacao (*Theobroma cacao L.*). Acta Agronomica, Palmira, vol.62, No.3, Jul. 2013.
- [4] SUÁREZ, L. Aislamiento e identificación del hongo *Moniliophthora roreri* a partir de cultivos de cacao ubicados en Norte de Santander- Colombia. Universidad Pablo de Olavide. Tesina. Sevilla, España. 2004.
- [5] Manual de Laboratorio de Sanidad Vegetal. Preparación de cámara humedad para hongos. UFPS. 2000.
- [6] SUÁREZ, L. Extracción y purificación del ADN de *Moniliophthora roreri* hongo que ataca el cacao, en Norte



- de Santander. Respuestas. Año 10, No. 2, Diciembre de 2005, p. 3-7.
- [7] SUÁREZ, L. Y RANGEL A. Aislamiento de microorganismos para control biológico de *Moniliophthora roreri*. Acta Agronómica vol. 62, No. 4, Octubre-Diciembre, 2013, p. 370-378.
- [8] ARIAS E, PIÑEROS P. Aislamiento e identificación de hongos filamentosos demuestras de suelo de los Páramos de Guasca y Cruz Verde (Tesis de pregrado). Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana; 2008. 204 p.
- [9] BARNETT, H.L., y HUNTER, B.B.1999. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Second edition. American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota, USA. 218 p.
- [10] MARTIN L. Caracterización molecular, fenotípica, patogénica y medios de control de *Phaeoacremonium aleophilum* y otros hongos asociados a los decaimientos de la vid en Castilla y León. 2013
- [11] PERDOMO Ziemis y HAYBRIG Mercedes. Caracterización fenotípica y molecular de hongos filamentosos oportunistas: *Scedosporium, acremonium, phialemonium, lecythophora* y *Paecilomyces*. 2011.
- [12] Luangsa-Ard J, J Houbraken, van Doorn T, Hong SB, Borman AM, Hywel-Jones NL, Samson AR. *Purpureocillium*, un nuevo género de la importancia médica *lilacinus Paecilomyces*". *FEMS Microbiology Letters*. (2011).