CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LOS HONGOS FILAMENTOSOS DURANTE EL PROCESO DE COMPOSTAJE

Laich, F.; Rodríguez, C.; Matallana, P.; Ledesma, J. y Alcoverro, T. R.
Instituto Canario de Investigaciones Agrarias. Ctra. El Boquerón s/n. 38270. Valle de Guerra. Tenerife. Email: flaich@icia.es - tpedrola@icia.es

PROGRAMA MAC 2007 - 2013 Cooperación Transnacional
Gobierno de Canarias Instituto Canario de Investigaciones Agrarias
UNIÓN EUROPEA FEDER
Bimusa

INTRODUCCIÓN

La identificación de hongos filamentosos por métodos tradicionales es compleja y requiere de personal cualificado. Asimismo, la alta diversidad de especies y la diversidad morfológica intraespecífica de los aislados que habitualmente se obtienen a partir de un compost, dificulta su correcta identificación. La utilización de técnicas moleculares que complementen la descripción morfológica y bioquímica, contribuyen a realizar una identificación fiable.

OBJETIVO

Caracterizar morfológica y molecularmente las principales especies fúngicas aisladas a partir de compost.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los aislados fúngicos se obtuvieron a partir de diferentes tipos de compost realizados en Canarias. La caracterización morfológica se realizó en los medios de cultivos Agar Czapek con Extracto de Levadura (CYA), Agar Extracto de Malta (MEA), Glicerol 25% Nitrato (G25N), Czapek 20 % Sacarosa (CY20S) y Dicloroanilina Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC), incubados a 25ºC y 37ºC durante siete días (Fig. 1). Se registraron las características macroscópicas y microscópicas de acuerdo a lo descrito por Samson *et al.* (2010) y Pitt & Hocking (2009), y se realizó una identificación a nivel de género. Posteriormente se realizó una extracción de ADN total y se amplificaron por la PCR el gen de la beta-tubulina (cebadores Bt2a y Bt2b) y el fragmento 5.8S-ITS del ADN ribosomal (cebadores ITS1 e ITS4). Los fragmentos amplificados fueron secuenciados y se realizó el alineamiento múltiple a través del programa CLUSTAL W versión 2.0 (Larkin *et al.*, 2007). Las secuencias fueron comparadas con la base de datos del GenBank y de la CBS a través de un BLASTN (Altschul *et al.*, 1997). Finalmente se realizó la identificación a nivel específico, comparando las secuencias de los aislados con las secuencias de las cepas tipo descritas en la bibliografía correspondiente, y elaborando un dendrograma con el método neighbour-joining a través del programa MEGA versión 5 (Tamura *et al.*, 2011).

Asimismo se realizó una restricción enzimática (RFLP) del ADN amplificado (beta-tubulina o 5.8S-ITS) con las enzimas *Hinf*I, *Cfo*I, *Hae*III, *Mbo*I y *Dde*I. A partir del patrón de restricción obtenido y de las secuencias del ADN correspondientes, se elaboró una base de datos de restricción enzimática para cada especie fúngica analizada.

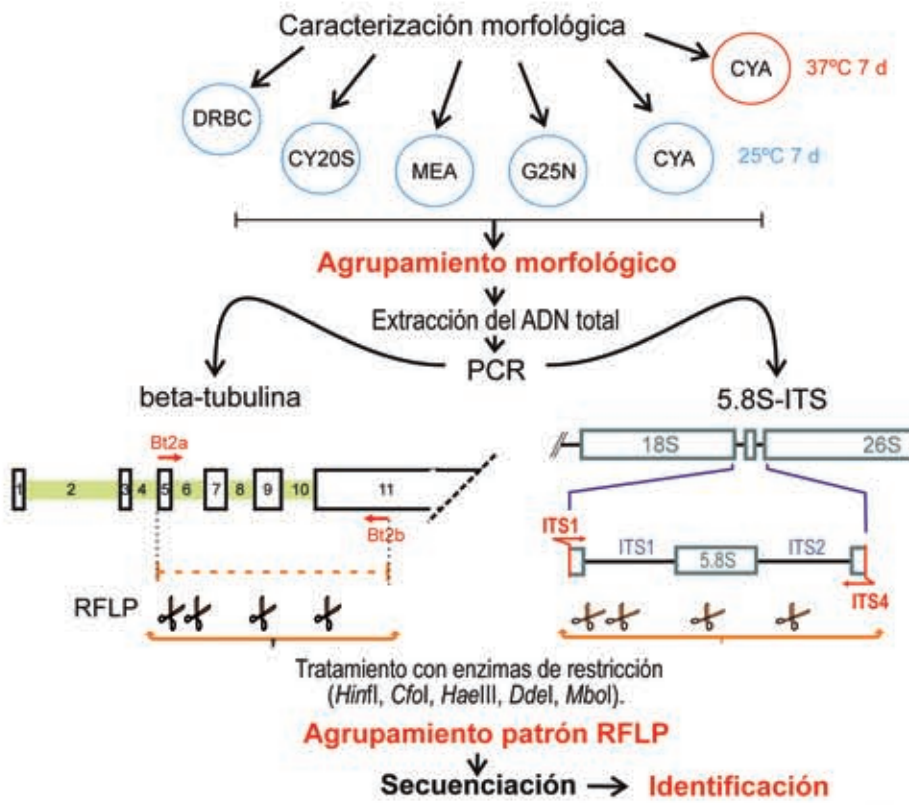


Figura 1. Esquema de actividades a realizar durante la identificación de hongos filamentosos (ver texto materiales y métodos).

RESULTADOS

Se realizó el registro de las características morfológicas (Fig. 2) y la determinación de los patrones RFLP (Tabla 1) de las principales especies fúngicas aisladas a partir de muestras de compost en diferentes tiempos del proceso de elaboración. La mayor diversidad de especies se detectó en el género *Aspergillus* y sus teleomorfos relacionados.

Especie	Gen	Tamaño amplificado (pb)	Fragmento secuenciado (pb)	HaeIII (pb)	CfoI (pb)	HinfI (pb)	DdeI (pb)	MboI (pb)
Aspergillus amoenus (=IMRL 4838^T)	Betatubulina	430	423	84-33-138-118-36-25	NC	155-268	415-8	160-134-129
Aspergillus fructus (=IMRL239^T)	Betatubulina	430	428	103+138+118+26+25	NC	158+268	418+8	163+134+129
Aspergillus sydowii (=IMRL 250^T)	Betatubulina	430	413	106+138+118+26+25	NC	74+335	405+8	150+134+129
Aspergillus recurvatus (=IMRL 4902^T)	Betatubulina	490	476	115+192+118+26+25	378+98	153+323	467+9	147+129
Emericella nidulans (=CBS 589.65^T)	Betatubulina	490	474	115-190-118-26-25	376-98	NC	466-8	145-129
Emericella quadrilineata (=IMRL 201^T)	Betatubulina	490	474	116-190-118-26-24	376-98	30-444	466-8	145-129
Emericella rugulosa (=IMRL 206^T)	Betatubulina	490	477	117-68-123-118-26-25	379-57-41	30-447	469-8	148-129
Aspergillus carbonarius (CBC 20384^T)	Betatubulina	580	515	132-333-26-24	253-252	56-141-131-7-180	89-476	31-308-307
Aspergillus niger (CBS 554.65^T)	Betatubulina	580	531	149-298-33-26-25	274-257	NC	46-10-45-430	303-228
Aspergillus tubingensis (=CBS 134.48^T)	Betatubulina	580	519	137-299-33-26-24	221-41-257	NC	43-282-217	291-100-128
Aspergillus terreus (IMRL 228^T)	Betatubulina	580	553	153+231+118+26+25	283+270	25+57+172+103+216	544+9	373+180
Aspergillus westerdijkiae (CBS 112803^T)	Betatubulina	580	515	96-378-26-15	25-83-138-271	515	2-513	6-390-119
Aspergillus flocculosus (=CBS 112788^T)	Betatubulina	580	582	163-269-89-59-15	173-157-241-11	131-451	103-479	220-363
Aspergillus flavus (=IMRL 1957^T)	Betatubulina	570	537	180+217+118+26+16	NC	NC	NC	85+157+35+140+120
Aspergillus fumigatus (=IMRL163^T)	Betatubulina	580	542	152+15+215+138+26+16	NC	370+172	67+475	57+222+86+57+120
Trichoderma harzianum (CBS 226.95^T)	5.8S-ITS	600	597	416+18+163	116+71+145+146+29+5+85	213+92+8+284	174+250+173	12+64+158+178+147+38
Trichoderma longibrachiatum (=CBS 816.68^T)	5.8S-ITS	610	613	406+12+82+83	90+25+237+146+29+5+87	74+159+92+8+289	159+433	9+97+148+178+143+88
Trichoderma viride (=ATCC 28020)	5.8S-ITS	600	598	417+181	123+205+149+30+5+86	209+92+8+289	100+233+176	23+207+201+139+39
Clonostachys rosea (=ATCC 52622)	5.8S-ITS	580	559	170+6+14+4+30+135	84+23+182+270	144+118+8+289	151+170+185+53	12+61+28+90+175+144+49
Fusarium equiseti	5.8S-ITS	550	528	103+386+79	84+190+245	256+8+91+173	185+194+189	14+61+133+304+30
Fusarium solani	5.8S-ITS	340	338	49-118-144-25	99-94-162-41	NC	83-245-8	207-129
Alternaria arborescens (=CBS 102605^T)	5.8S-ITS	580	550	422+128	299+140+111	272+8+186+154	NC	14+187+311+38

Los recuadros en gris indican la enzima de restricción más adecuada que permite realizar una identificación correcta.

Tabla 1. Fragmentos de restricción del gen de la Beta-tubulina o de la región 5.8S-ITS del ADNr. Los tamaños de los fragmentos fueron determinados a partir de las secuencias obtenidas de diferentes cepas fúngicas aisladas a partir de compost. En la primer columna se hace referencia a la especie correspondiente y a la cepa tipo utilizada para la identificación.

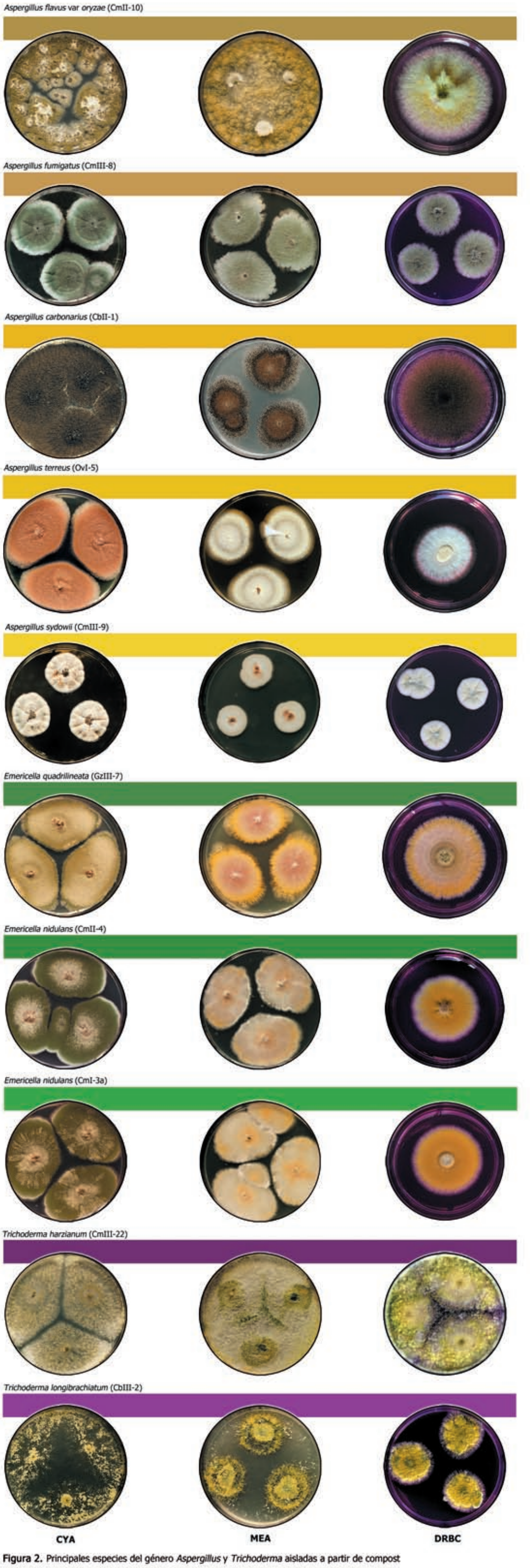


Figura 2. Principales especies del género *Aspergillus* y *Trichoderma* aisladas a partir de compost

Bibliografía

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res 25, 3389–3402.

Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A. & otros autores. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics 23, 2947-2948.

Pitt J.I. & Hocking A.D. 2009. Fungi and food spoilage. Springer Science. London.

Samson, R. A., Houbraken, J., Thrane, U., Frisvad, J.C. & Andersen, B. 2010. Food and Indoor Fungi. CBS Laboratory Manual Series no. 2. Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol Biol Evol 28, 2731–2739.