

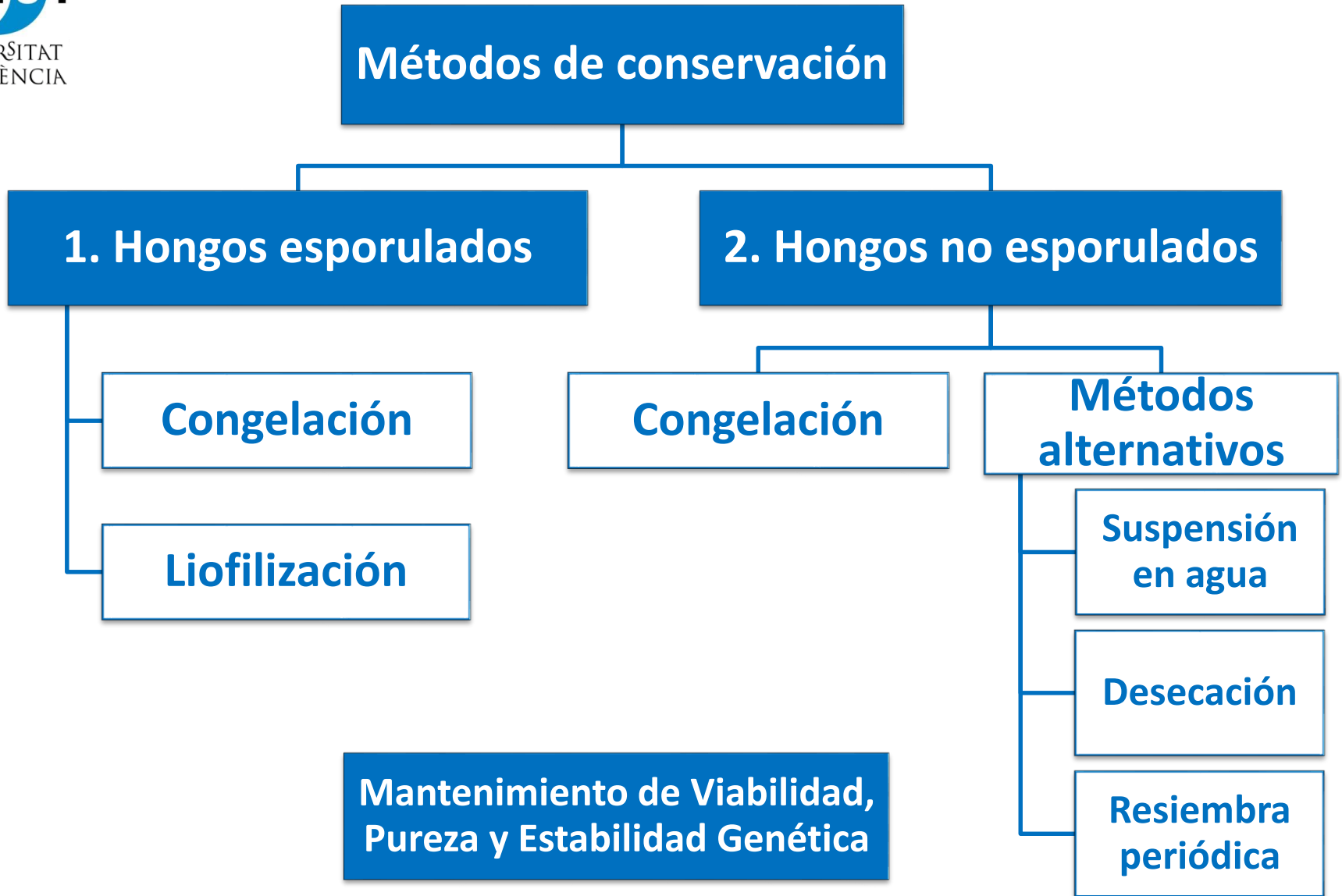


Identificación y conservación de hongos fitopatógenos, siguiendo los estándares de un Centro de Recursos Microbianos



Laura López Ocaña

Curator de Eucariotas. CECT



CONSERVACIÓN POR CONGELACIÓN

Factores principales implicados en el proceso

Material a conservar

- Cultivos en fases de crecimiento **tardías** o **estacionarias**

Crioprotectores

- **Glicerol**
 - 10% glicerol para -80°C y -196°C
 - 30% glicerol para -20°C

Velocidad de enfriamiento

- Enfriamiento **lento** de los cultivos ($\sim 1^{\circ}\text{C}/\text{min}$)

Temperatura de almacenamiento

- Mejor cuanto más baja (**temperaturas inferiores a -150°C**)

Descongelación

- **Descongelación rápida** por inmersión directa en un baño de agua entre 35°C y 37°C

Procedimiento para hongos esporulados

Preparar suspensión de esporas (10^6 - 10^7 esporas/ml) en solución salina o en agua destilada con Tween 80 (0.1%)

Repartir 0.5 ml de la suspensión anterior en criotubos previamente preparados con 1ml de glicerol al 15% (v/v)

Dejar a temperatura ambiente durante 20 - 30 minutos y enfriar en nevera (5°C) durante al menos 30 minutos

Enfriamiento lento de los cultivos
($\sim 1^{\circ}\text{C}/\text{min}$)

Congelar a temperaturas inferiores a -80°C



Procedimiento para hongos no esporulados

Cultivo en fase tardía de crecimiento o principio de la estacionaria (1-2 semanas)

Cortar cubos de 0,5 x 0,5 cm de la placa de agar donde está el hongo crecido

Introducir los tacos de agar, en número de 4 a 5, en criotubos que contengan glicerol 10%

Dejar a temperatura ambiente durante 15-20 minutos y enfriar en nevera (5°C) durante al menos 30 minutos

Enfriamiento lento de los cultivos (~1°C/min)

Congelar a temperaturas inferiores a -80°C



Procedimiento para hongos ectomicorrícios (Crahay et al. 2013a)

Crecimiento directo del hongo en criovial, hasta fase estacionaria tardía (7-9 semanas) a 22-23°C

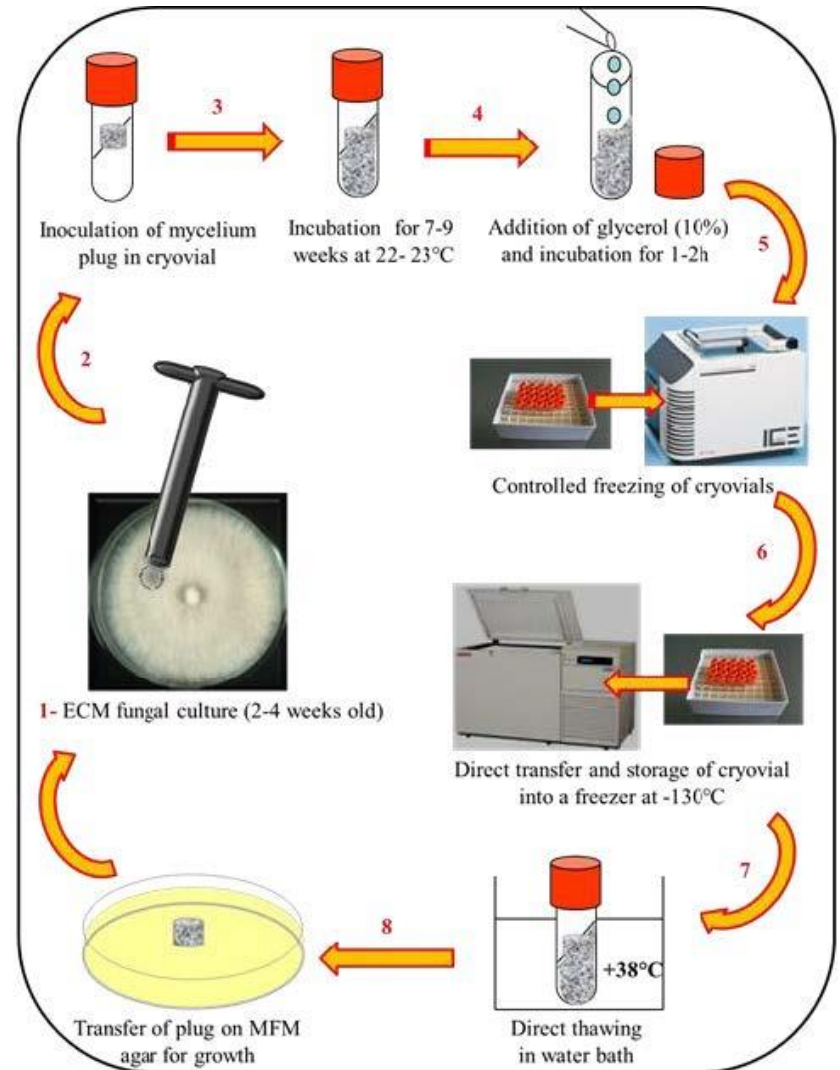
Cubrir con Glicerol al 10% e incubar durante 1-2h

Enfriar en nevera (5°C) durante al menos 30 minutos

Congelación programada (~1°C/min)

Congelar en Nitrógeno Líquido (-196°C) o en fase de vapor (-150°C)

Conservación por congelación



- Crahay, C., Declerck, S., Colpaert, JV., Pigeon, M., Munaut, F. (2013a). Viability of ectomycorrhizal fungi following cryopreservation. *Fungal Biol* 117:103–111

- Lalaymia, I. & Cranenbrouck, S. & Declerck, S. (2014). Maintenance and preservation of ectomycorrhizal and arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 24:323–337. DOI 10.1007/s00572-013-0541-8

CONSERVACIÓN POR LIOFILIZACIÓN

Factores principales implicados en el proceso

Material a conservar

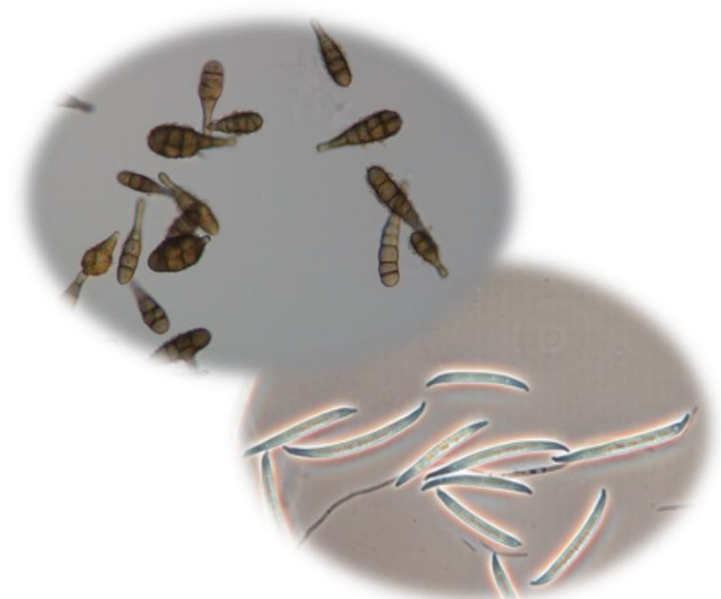
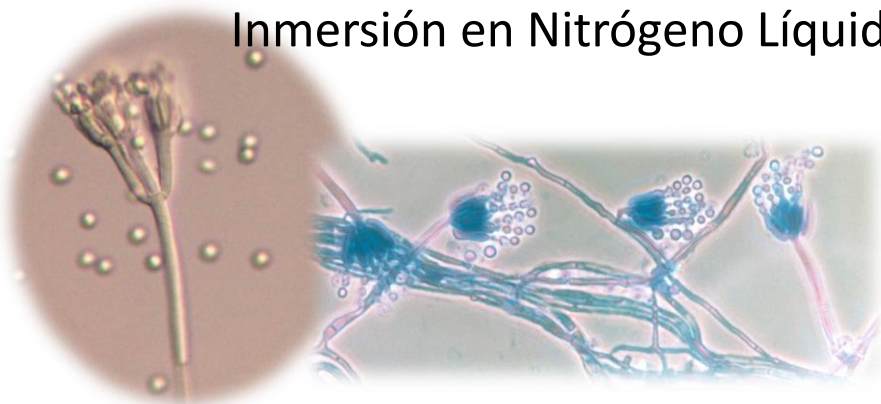
- Cultivos **esporulados** (10^6 - 10^7 esporas/ml)

Crioprotectores

- **Leche descremada estéril (10%w/v)**

Velocidad de enfriamiento en el proceso de congelación

- Para hongos de esporas grandes
Congelación a -80° C, 2h
- Para hongos de esporas pequeñas
Inmersión en Nitrógeno Líquido





Temperatura durante la sublimación

- Debe ser lo más baja posible

Grado de deshidratación alcanzado

- Debe ser lo más alto posible

Atmósfera en el tubo

- Tubos cerrados al vacío, sin presencia de oxígeno

Almacenamiento

- Conservar el vial en un lugar fresco (10-18°C), seco y en oscuridad
- Importante no bajar de 0°C

CONSERVACIÓN EN AGUA

- Es un método de conservación alternativo
- El metabolismo baja por privación de nutrientes
(pero **la inactivación no es total**)
- Células fácilmente recuperables
- Fácil, simple y económico

Método utilizado en la CECT para hongos pertenecientes a la división Basidiomycota (*Agaricus*, *Agrocybe*, etc.) y a la división Oomycota, donde destacan importantes géneros fitopatógenos como *Pythium* y *Phytophthora*.

Procedimiento

Cultivo en fase tardía de crecimiento o principio de la estacionaria (1-2 semanas)

Cortar cubos de 0,5 x 0,5 cm de la placa de agar donde está el hongo crecido

Introducir los tacos de agar, en número de 4 a 5, en tubos de cierre hermético que contengan agua destilada estéril

Almacenar en oscuridad a temperatura controlada (18-20°C)

Procedimientos

Con requerimiento de sales

Soluciones salinas (ej. ASW o agua de mar envejecida filtrada estéril al 50%)

Esporulados

Agua con Tween 80 al 0,1%

Densidad celular baja ($\leq 10^5$ células/ml)

Almacenar en oscuridad a temperatura controlada (18-20°C)

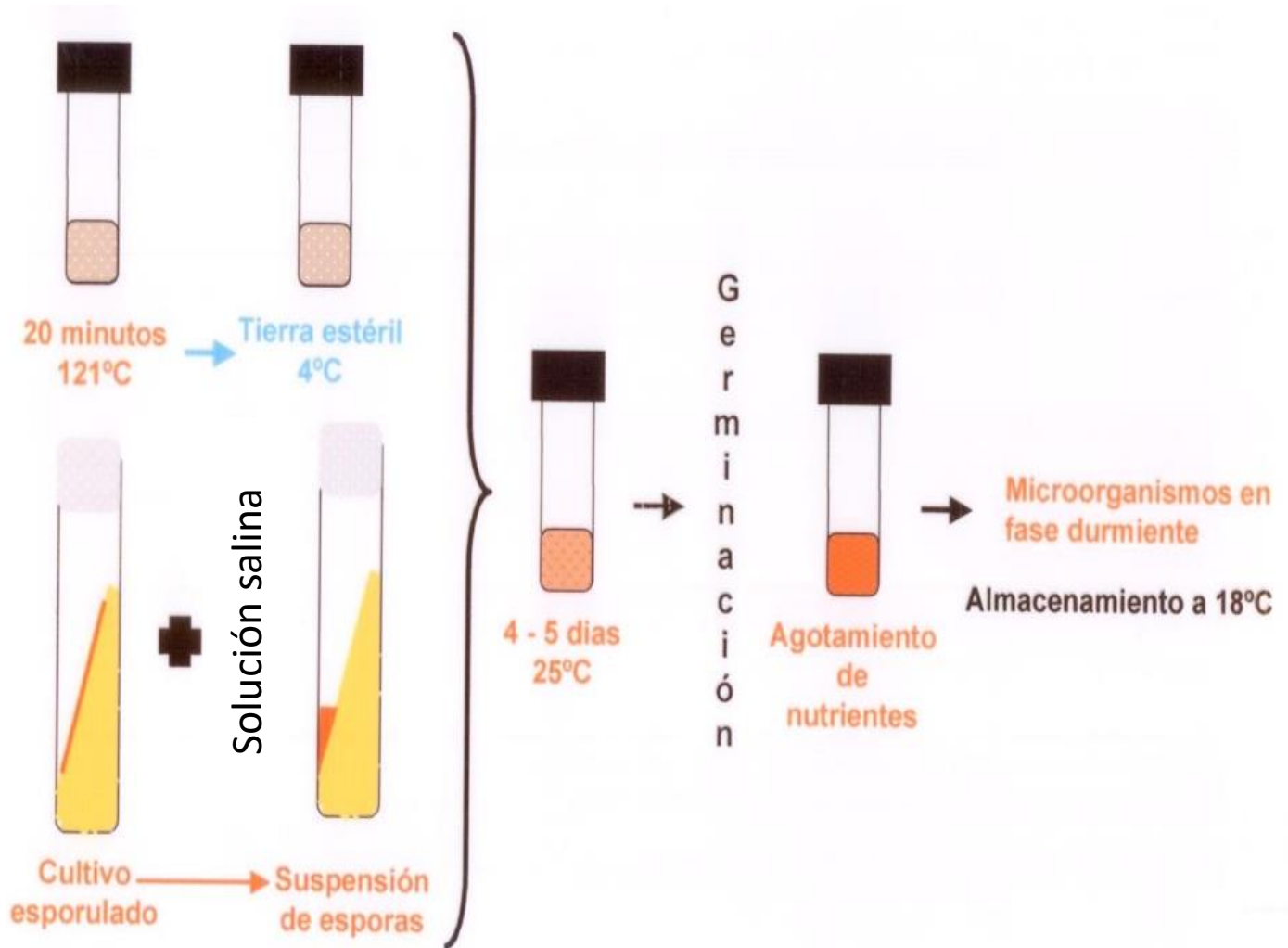
CONSERVACIÓN POR DESECACIÓN

- Es un método de conservación alternativo
- El metabolismo baja por la eliminación del agua
- Se puede conseguir de muchos modos (corriente de aire seco, material absorbente, vacío, etc)
- En general son de aplicación fácil, simples y económicos
- **Aplicabilidad poco contrastada. Problemas de contaminación**
- **Evitar películas y costras que dificulten la desecación**

Métodos:

- Silicagel, **Tierra**, Celulosa (tiras o discos)
- Leche descremada, almidón o dextrano
- Gelatina, **Alginato**, Sal

Tierra



Alginato



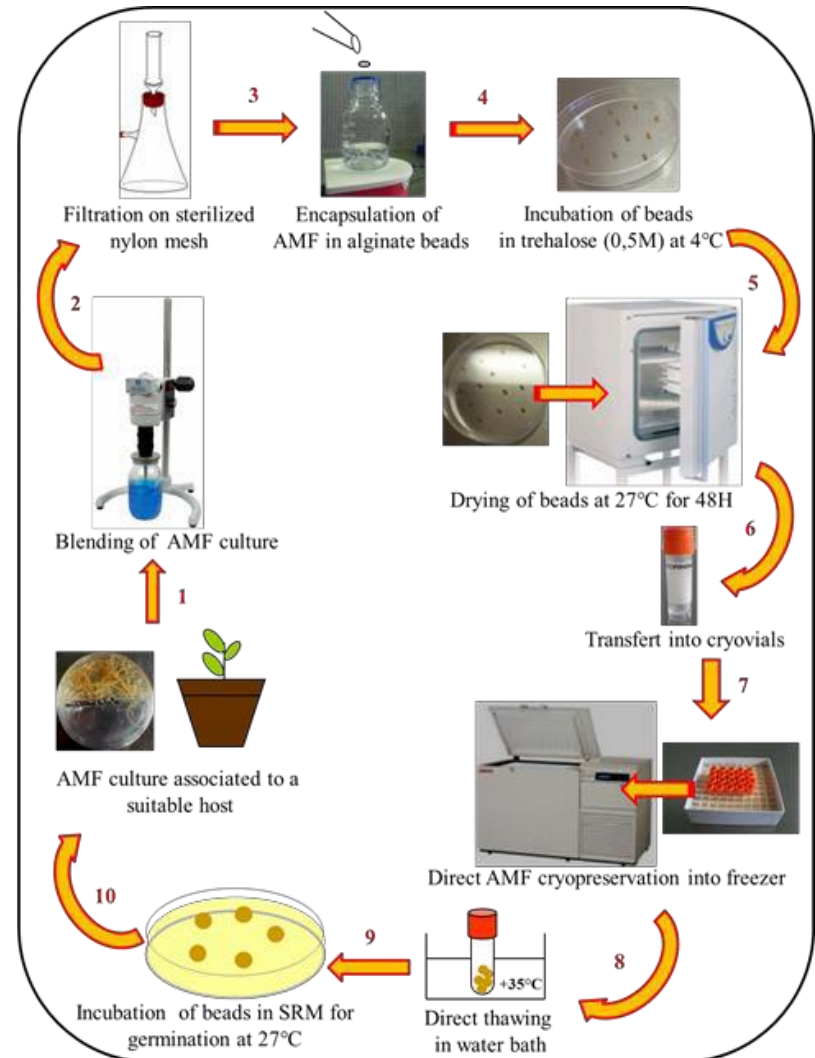
Hongos asociados a su hospedador

Encapsulación de propágulos en perlas de alginato

Incubación durante la noche en Trehalosa (0.5M)

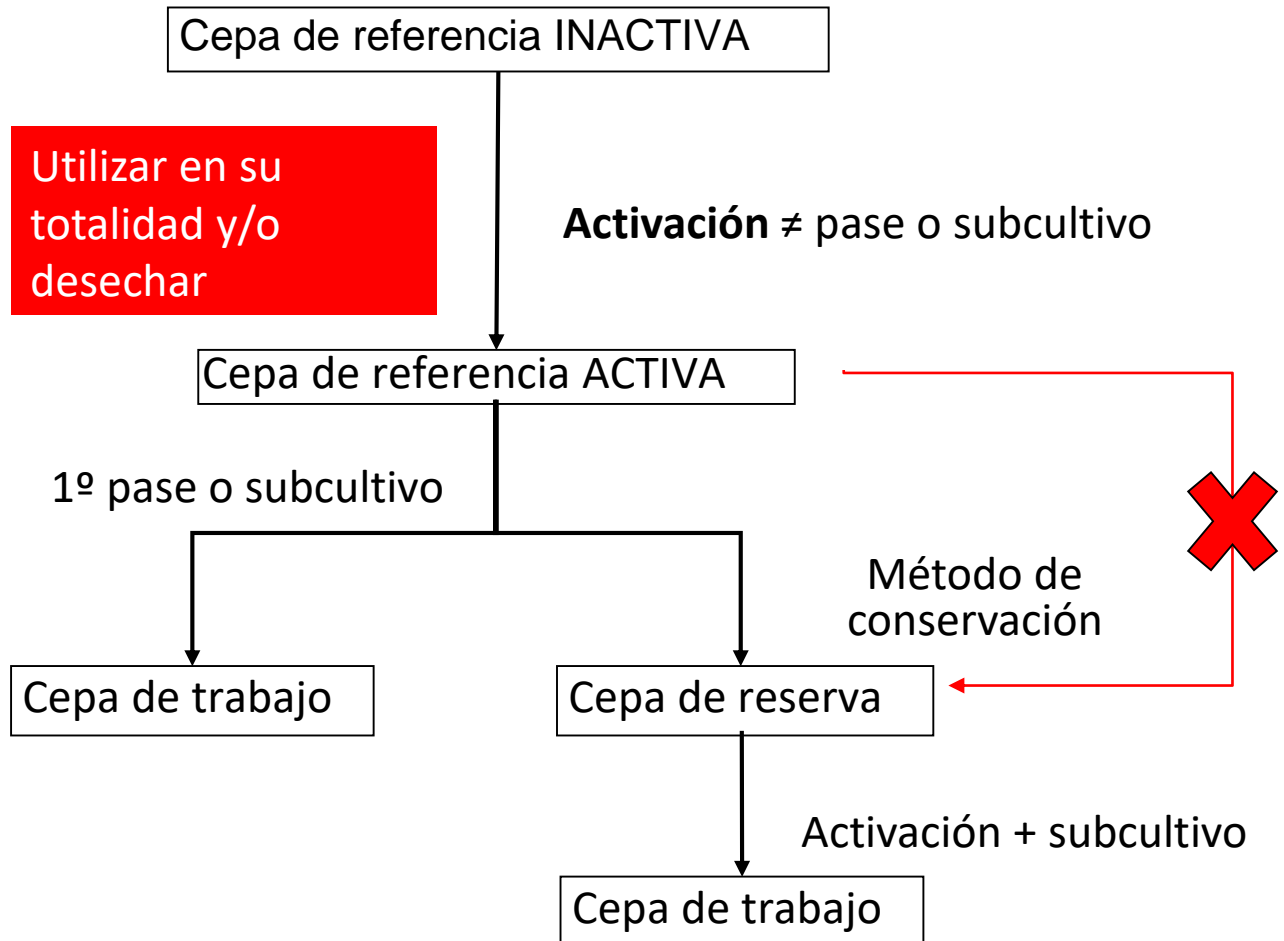
Secado de las perlas durante 48h a 27 ° C

Congelar en Nitrógeno Líquido (-196°C) o en fase de vapor (-150°C)



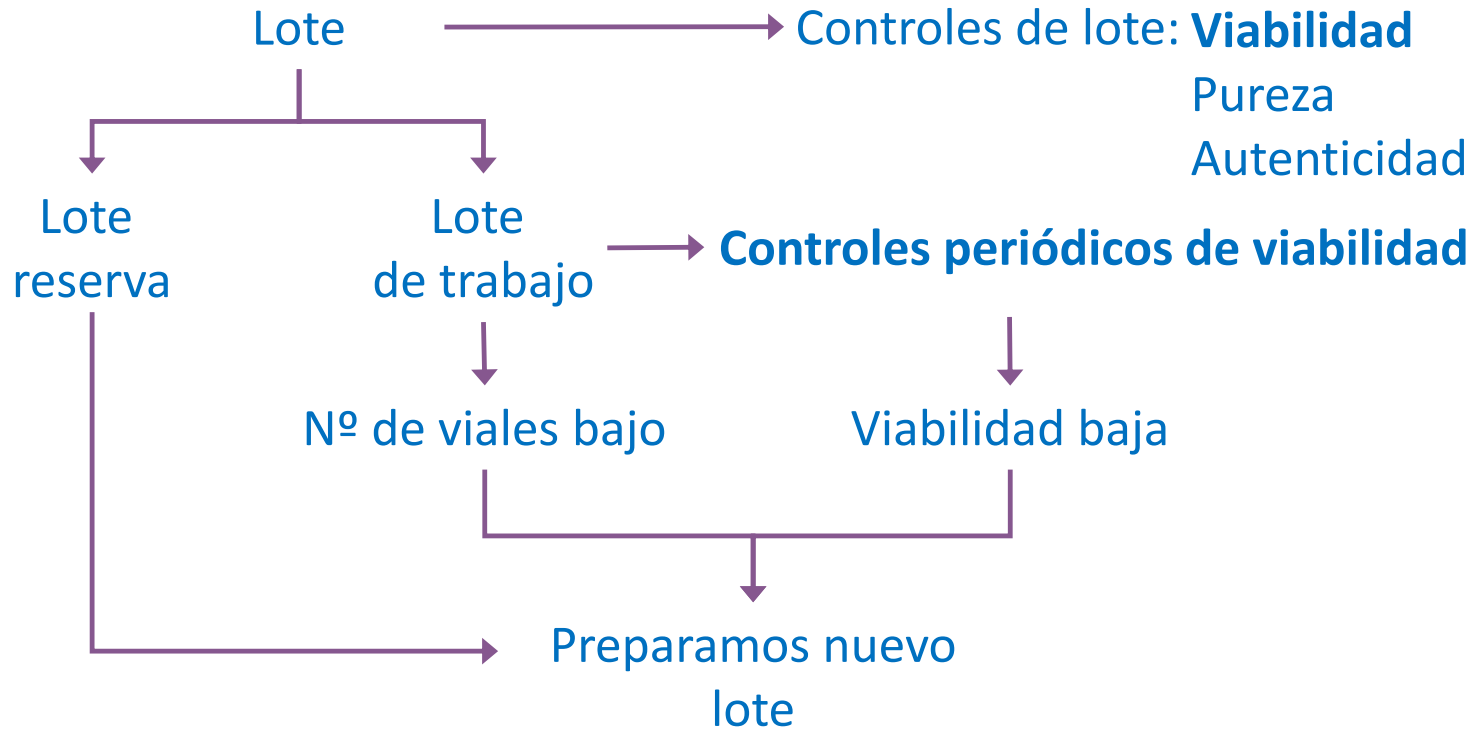
- Lalaymia L, Cranenbrouck S, Draye X, Declerck S (2012) Preservation at ultra-low temperature of in vitro cultured arbuscular mycorrhizal fungi via encapsulation-drying. Fungal Biol 116:1032–1041.
- Lalaymia, L., Cranenbrouck, S. and Declerck, S. (2014). Maintenance and preservation of ectomycorrhizal and arbuscular mycorrhizal fungi Mycorrhiza (2014) 24:323–337. DOI 10.1007/s00572-013-0541-8

Esquema general de uso de cepas de referencia inactivas en el laboratorio (consensuado con ENAC en julio de 2011)

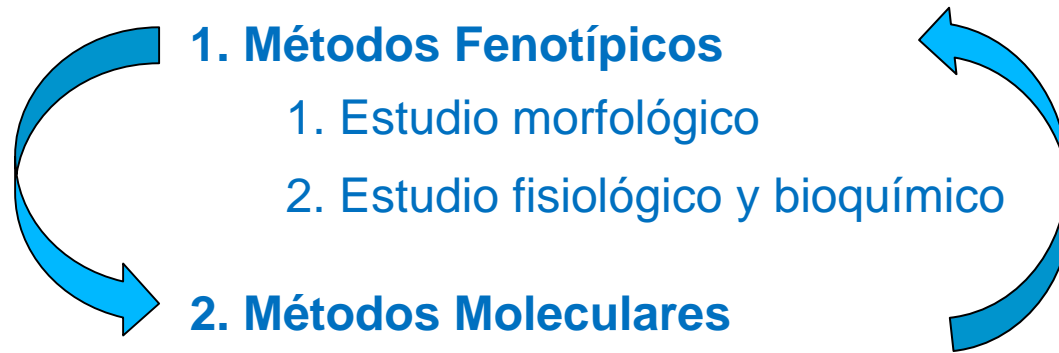


Es necesario hacer un 1º pase o subcultivo antes de utilizar la cepa de referencia ACTIVADA

CONTROL DE VIABILIDAD



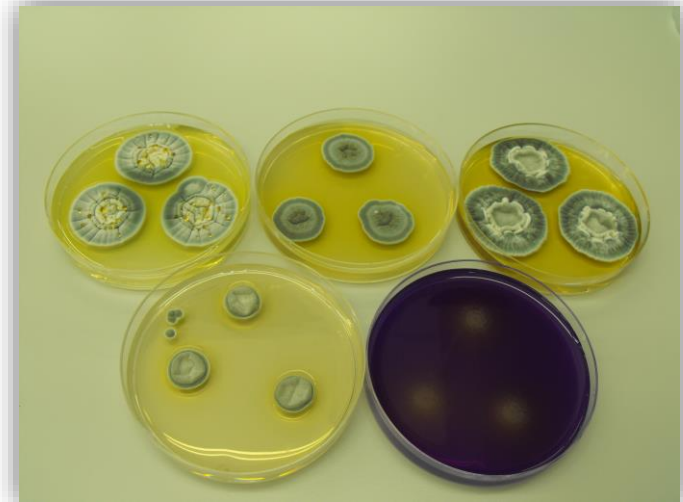
IDENTIFICACIÓN DE HONGOS FITOPATÓGENOS



MÉTODOS FENOTÍPICOS

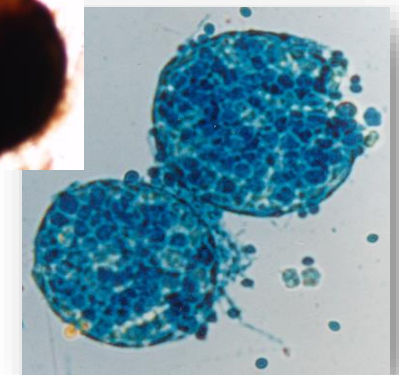
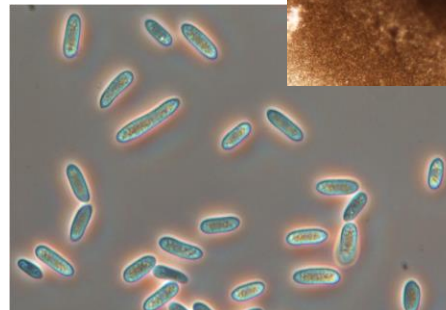
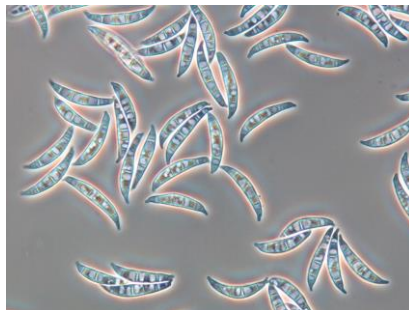
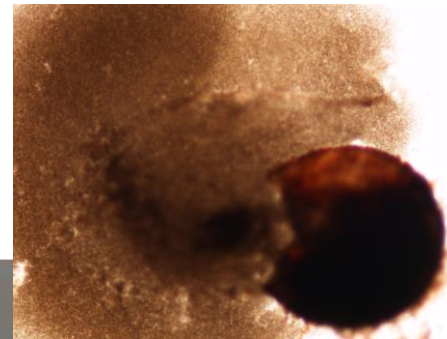
ESTUDIO MORFOLÓGICO: NIVEL MACROSCÓPICO

- Diámetro de las colonias
- Color
- Textura
- Exudado
- Pigmento difusible, etc.

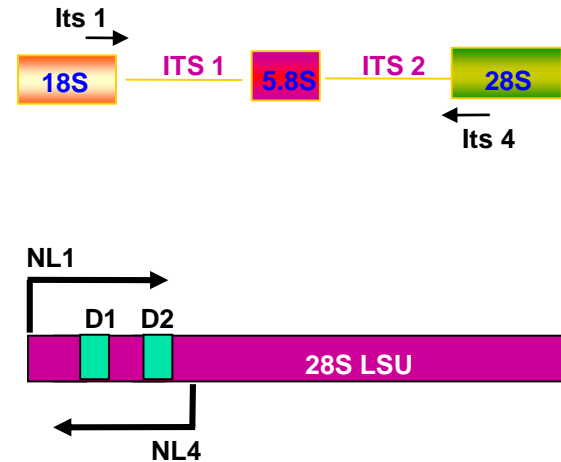
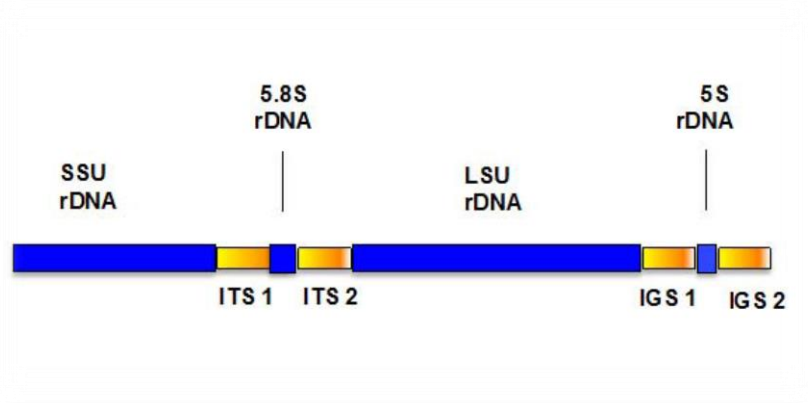


ESTUDIO MORFOLÓGICO: NIVEL MICROSCÓPICO

- Conidióforos
- Conidios: forma, superficie, etc.
- Presencia de esclerocios o picnidios
- Tipo de reproducción: asexual y sexual



- SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DEL DNA RIBOSÓMICO



Desarrollo de bases de datos (barcode)

- Región ITS (Schoch et al. 2012)
- (D1/D2) 28S rRNA (Kurtzman et al., 1998, 2011)

- SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE OTROS GENES

Genes Housekeeping (genes codificantes de proteínas)

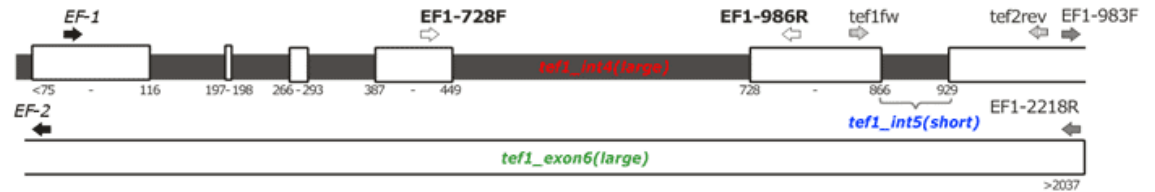
- β -Tubulina
- Actina (ACT)
- Factor de elongación de la traducción (EF-1 α)
- Calmodulina (CAL)
- Segunda subunidad mayor de la RNA polimerasa II (RPB2)

• Secuenciación y Análisis de otros genes

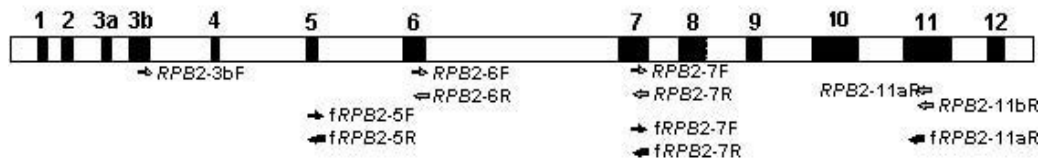
➤ β-Tubulina



➤ Factor de elongación
 (EF-1α)



➤ RPB2



• BASES DE DATOS PÚBLICAS



- **NCBI**
(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)
Región ITS: subconjunto de secuencias de referencia (RefSeq)



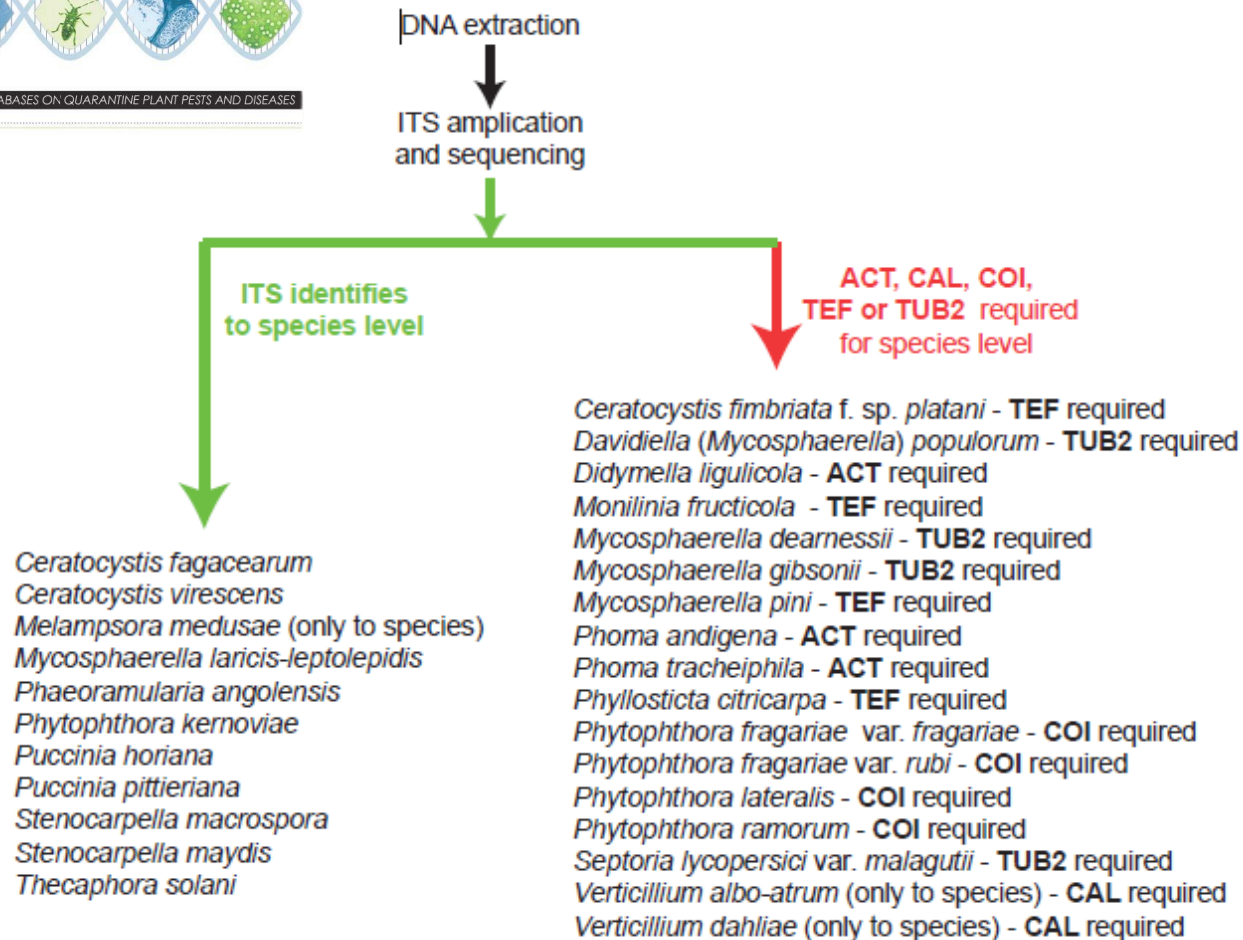
- **MYCOBANK**
(<http://www.mycobank.org>)

#	Organism(s) involved	Hyperlink and website	Polyphasic identification possible
2.	Aspergillus & Penicillium	CBS website	Yes
3.	Ceratocystis	Q-bank website	Yes
4.	Colletotrichum	Q-bank website	Yes
6.	Fusarium MLST	CBS website	Yes
14.	Monolinia	Q-bank website	Yes
16.	Penicillium subgenus Penicillium	CBS website	Yes
17.	Phaeoacremonium	CBS website	Yes
18.	Phoma	Q-bank website	Yes
19.	Phytophthora	Q-bank website	Yes

- **Fusarium MLST**
(<http://www.westerdijknstitute.nl/fusarium/>)

- **Q-bank** (<http://www.q-bank.eu/fungi/>)

• BASES DE DATOS PÚBLICAS

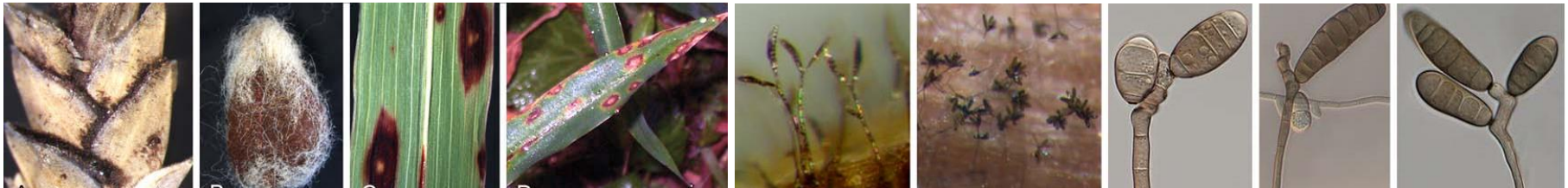


- BASES DE DATOS PÚBLICAS

Genera of phytopathogenic fungi: GOPHY 1

(<http://www.plantpathogen.org/>)

Iniciativa de la Subcomisión Internacional para la Taxonomía de los Hongos Fitopatógenos y del Comité Internacional para la Taxonomía de los Hongos



Y. Marin-Felix, J.Z. Groenewald, L. Cai, Q. Chen, S. Marinowitz, I. Barnes, K. Bensch, U. Braun, E. Camporesi, U. Damm, Z.W. de Beer, A. Dissanayake, J. Edwards, A. Giraldo, M. Hern_andez-Restrepo, K.D. Hyde, R.S. Jayawardena, L. Lombard, J. Luangsa-ard, A.R. McTaggart, A.Y. Rossman, M. Sandoval-Denis, M. Shen, R.G. Shivas, Y.P. Tan, E.J. van der Linde, M.J. Wingfield, A.R. Wood, J.Q. Zhang, Y. Zhang, and P.W. Crous (2017). Genera of phytopathogenic fungi: GOPHY 1. *STUDIES IN MYCOLOGY* 86: 99–216 (2017). May 2017; <http://dx.doi.org/10.1016/j.simyco.2017.04.002>

Bipolaris

Shoemaker Canad. J. Bot. 37: 882. 1959.

- Synonym: *Cochliobolus* Drechsler, Phytopathology 24: 973. 1934.
- Classification: *Dothideomycetes*, *Pleosporomycetidae*, *Pleosporales*, *Pleosporaceae*.
- Type species: *Bipolaris maydis* (Y. Nisik. & C. Miyake) Shoemaker.
Neotype and ex-neotype culture: ATCC 48332, CBS 137271.
 - **DNA barcodes (genus): LSU, ITS.**
 - **DNA barcodes (species): ITS, *gapdh*, *tef1*.**

- **Condiciones de cultivo y características**
- **Distribución**
- **Huesped**
- **Síntomas de la enfermedad**

DNA barcodes of accepted *Bipolaris* spp.

Species	Isolates ¹	GenBank accession numbers ²			References
		ITS	<i>gapdh</i>	<i>tef1</i>	
<i>Bi. austrostipae</i>	BRIP 12490 ^T	KX452442	KX452408	KX452459	Tan <i>et al.</i> (2016)
<i>Bi. axonopicola</i>	BRIP 11740 ^T	KX452443	KX452409	KX452460	Tan <i>et al.</i> (2016)
<i>Bi. bamagaensis</i>	BRIP 13577 ^T	KX452445	KX452411	KX452462	Tan <i>et al.</i> (2016)
<i>Bi. bicolor</i>	CBS 690.96	KJ909762	KM042893	KM093776	Manamgoda <i>et al.</i> (2014)
<i>Bi. chloridis</i>	BRIP 10965 ^T	KJ415523	KJ415423	KJ415472	Tan <i>et al.</i> (2014)
<i>Bi. clavata</i>	BRIP 12530 ^T	KJ415524	KJ415422	KJ415471	Tan <i>et al.</i> (2014)
<i>Bi. coffeana</i>	BRIP 14845 ^{ISO T}	KJ415525	KJ415421	KJ415470	Tan <i>et al.</i> (2014)
<i>Bi. cookei</i>	AR 5185	KJ922391	KM034833	KM093777	Manamgoda <i>et al.</i> (2014)
<i>Bi. crotonis</i>	BRIP 14838	KJ415526	KJ415420	KJ415479	Tan <i>et al.</i> (2014)
<i>Bi. cynodontis</i>	CBS 109894	KJ909767	KM034838	KM093782	Manamgoda <i>et al.</i> (2014)
<i>Bi. drechsleri</i>	CBS 136207 ^T	KF500530	KF500533	KM093760	Crous <i>et al.</i> (2013), Manamgoda <i>et al.</i> (2014)
<i>Bi. gossypina</i>	BRIP 14840 ^T	KJ415528	KJ415418	KJ415467	Tan <i>et al.</i> (2014)

- ITS: V9G/ITS4
- GAPDH: *gpd1/gpd2*
- TEF1 α : EF1 983/EF1 2218R

Muchas gracias