



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
LICENCIATURA EN MICROBIOLOGÍA



Identificación y caracterización de bacterias asociadas a cepas de *Arthrobotrys oligospora* nativas de Querétaro

Tesis Individual

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Licenciada en Microbiología

Presenta

Olivia Dhamaris Quevedo Cruz

Director

Dr. Edgardo Ulises Esquivel Naranjo



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Identificación y caracterización de bacterias asociadas
a cepas de *Arthrobotrys oligospora* nativas de
Querétaro

por

Olivia Dhamaris Quevedo Cruz

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0
Internacional](#).

Clave RI: CNLIN-247605



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
LICENCIATURA EN MICROBIOLOGÍA



**Identificación y caracterización de bacterias asociadas a cepas de *Arthrobotrys*
oligospora nativas de Querétaro**

TESIS INDIVIDUAL

Que como parte de los requisitos para obtener el título de

LICENCIADA EN MICROBIOLOGÍA

Presenta

Olivia Dhamaris Quevedo Cruz

Dr. Edgardo Ulises Esquivel Naranjo
Director

Firma

Dr. Fidel Landeros Jaime
Secretario

Firma

Dr. José Antonio Cervantes Chávez
Vocal

Firma

Dra. Angelina Rodríguez Torres
Vocal

Firma

M.En C. Víctor Javier García Sánchez
Vocal

Firma

Agradecimientos

Al Fondo de Proyectos especiales de Rectoría (FOPER) por el financiamiento otorgado para poder realizar este proyecto.

Al Dr. Edgardo Ulises Esquivel Naranjo por haberme aceptado en su laboratorio y haberme brindado todo su conocimiento, consejos, confianza, paciencia, pero sobre todo por el apoyo para continuar dentro del área de investigación.

A la Dra. Talina, que además de ser una a de mis sinodales fue mi tutora a lo largo de toda la carrera, gracias por siempre haberme escuchado y aconsejado, de verdad es una gran inspiración para mí.

Al Dr. Antonio Cervantes y al Dr. Fidel Landeros por toda su ayuda, recomendaciones, tutorías, ¡gracias por todo!

A LAMIMO, mi otra casa por más de un año, Chava, Juanis, Víctor, gracias por todos los consejos, por toda esa ayuda incondicional, pero sobretodo por todos esos momentos inolvidables llenos de risas que pasamos en el laboratorio, lo quiero mucho. Al buen Dani, de verdad no sabes cómo agradezco haberte conocido, gracias por literalmente todo, por ayudarme desde a hacer cálculos hasta repetir miles de veces esos antibiogramas, gracias por escucharme quejar siempre, por los consejos y por llevarme el mejor pancito para chismear por las mañanas.

A toda mi familia, por siempre haber estado ahí e impulsarme a seguir y no darme por vencida, pero a mi mamá por ser mi apoyo incondicional, gracias mamás por siempre brindarme una sonrisa, un abrazo o una buena taza de café cuando más lo necesitaba, te quiero muchísimo.

ÍNDICE GENERAL

1	Introducción	11
2	Antecedentes	12
2.1	Hongos nematófagos	12
2.2	Endoparásitos	12
2.3	Oportunistas/ ovicidas	13
2.4	Depredadores o atrapa nematodos	14
2.5	Tipos de trampas.....	14
2.5.1	Anillo constrictor	14
2.5.2	Columnas/ramas adhesivas.....	16
2.5.3	Anillos no constrictores.....	16
2.5.4	Botones adhesivos	17
2.5.5	Redes adhesivas	18
2.6	Género <i>Arthrobotrys</i>	19
2.7	<i>Arthrobotrys oligospora</i>	19
2.7.1	Generalidades de <i>A. oligospora</i>	20
2.8	Biocontrol de hongos fitopatógenos	21
2.8.1	Hongos fitopatógenos.....	21
2.9	Métodos convencionales de control	23
2.9.1	Control cultural	23
2.9.2	Control químico	23
2.9.3	Control biológico.....	24
2.9.4	Uso de hongos nematófagos como agentes de biocontrol.....	24
2.9.5	Uso de bacterias como agentes de biocontrol	25
2.10	Simbiosis hongo-bacteria	25
2.11	Bacterias asociadas con <i>A. oligospora</i>	27
3	Justificación	29
4	Hipótesis	30
5	Objetivo general.....	31
6	Objetivos específicos	31

7	Materiales y métodos	32
7.1	Cepas y condiciones de cultivo	32
7.2	Inhibición de crecimiento fúngico con benomilo.....	32
7.3	Separación de las bacterias de <i>A. oligospora</i>	32
7.4	Tinción Gram.....	32
7.5	Extracción de ADN.....	33
7.5.1	Extracción de ADN a partir de bacterias aisladas	33
7.5.2	Extracción de ADN a partir de micelio	34
7.6	Amplificación del gen 16S rRNA.....	35
7.7	Amplificación del marcador los ITSs de <i>A. oligospora</i>	35
7.8	Purificación de reacciones de PCR	35
7.9	Análisis filogenéticos	36
7.10	Prueba de susceptibilidad a antibióticos.....	37
7.11	Pruebas bioquímicas API®.....	37
7.12	Remoción de las bacterias asociadas a <i>A. oligospora</i>	39
7.13	Antagonismo	39
8	Resultados	41
8.1	Inhibición de crecimiento fúngico con benomilo en medio PDA.....	41
8.2	Crecimiento bacteriano con benomilo en medio LB.....	42
8.3	Separación de las bacterias de <i>A. oligospora</i>	43
8.4	Pruebas bioquímicas API®.....	44
8.5	Amplificación del gen ribosomal 16S.....	45
8.6	Purificación de las reacciones de PCR.....	47
8.7	Susceptibilidad a diferentes antibióticos en las bacterias asociadas a <i>A. oligospora</i>	52
8.8	Generación de cultivos de <i>A. oligospora</i> libres de bacterias.....	55
8.9	Ensayo de antagonismo	56
9	Discusión	61
9.1	Identificación de bacterias asociadas al hongo nematófago <i>A. oligospora</i> ...	61

10	Conclusión	64
11	Perspectivas	64
12	Bibliografía	66
13	Apéndices	73
14	Anexos	74

Índice de figuras

Figura 1.	Anillo constrictor de hongos nematófagos.....	15
Figura 2.	Columnas adhesivas de hongos nematófagos.....	16
Figura 3.	Anillos no constrictores de hongos nematófagos.....	17
Figura 4.	Botones adhesivos de hongos nematófagos.....	18
Figura 5.	Redes adhesivas de hongos nematófagos.	19
Figura 6.	Simbiosis bacteria hongo.....	26
Figura 7.	Inhibición de las siete cepas de <i>A.oligospora</i> con benomilo en medio PDA.	41
Figura 8.	Inhibición de las siete cepas de <i>A.oligospora</i> con benomilo en medio Luria Bertani (LB).	42
Figura 9.	Tinción de gram.	43
Figura 10.	Pruebas bioquímicas API®.	44
Figura 11.	ADN genómico de las bacterias aisladas a partir de cultivos fúngicos.	46
Figura 12.	Amplificación del gen ribosomal 16S.	46
Figura 13.	Purificación de la reacción de PCR a partir de ADN genómico de las bacterias aisladas.	47
Figura 14.	Árbol filogenético basado en inferencia bayesiana.....	49
Figura 15.	Árbol filogenético basado en máxima verosimilitud.....	51
Figura 16.	Pruebas de susceptibilidad a antibióticos.....	53
Figura 17.	Amplificación de la región ribosomal 16s en cepas de <i>A.oligospora</i> pre y post limpieza.	55
Figura 18.	Amplificación de la región ITS1-5.8S-ITS2 de cepas de <i>A.oligospora</i> ..	56
Figura 19.	Prueba de antagonismo.	57

Índice de tablas

Tabla1. Porcentaje de inhibición.	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 2. BlastN.	48
Tabla 3. Lista de especies usadas como referencia para análisis filogenéticos.....	73

Resumen

Arthrobotrys, es un género de ascomicetos descrito por primera vez en 1839 por Corda (Liou, et al., 1997). Actualmente, este representa el grupo más grande de hongos nematófagos, con un estimado de 53 especies (Jiang, et al., 2017). Dentro de este género, una de las especies más estudiadas es *Arthrobotrys oligospora* por su potencial como agente de biocontrol dado que posee una distribución mundial, un ciclo de vida corto, una alta tasa de reproducción, genera estructuras de resistencia para su aplicación en campo y sobre todo no es de carácter patógeno para humanos, representando así una alternativa amigable y viable para su producción, comercialización y aplicación (Arroyo-Balán, et al., 2021).

Diversos estudios han reportado que este nematófago, posee una interacción simbiótica con bacterias pertenecientes al suborden de *Stenotrophomonas* y *Rhizobium* potenciando la formación de trampas formadas por parte del hongo (Li et al., 2016). En este caso se trabajó con siete cepas de *Arthrobotrys oligospora* aisladas del estado de Querétaro (A6, A12, A13, R2-1, R2-6, R2-13 y R2-14) las cuales contaban con bacterias asociadas. Se buscó la manera de aislarlas e identificarlas para ver si pertenecían a algún género previamente descrito asociado con *A. oligospora* así como determinar el impacto que estas presentan en cuanto a la inhibición o reducción del de crecimiento de fitopatógenos de importancia en el sector agropecuario.

Las bacterias fueron identificadas como *Bacillus amyloliquefaciens*, bacilos Gram negativo, altamente susceptibles a antibióticos como la ampicilina que, a pesar de haber sido aisladas de los municipios de El Marqués y Jalpan de Serra, los análisis filogenéticos muestran que son genéticamente muy similares.

Los ensayos de antagonismo demostraron que existe un fuerte antagonismo contra *A. alternata* y *S. rolfii*, una actividad antagónica moderada contra *F. oxysporum* y *C. gloeosporioides* y mínima actividad contra *B. cinerea* y *R. solani*. Así mismo al retirar las bacterias de las cepas de *A. oligospora* y repetir el ensayo de antagonismo se encontró que el organismo que inhibe el crecimiento y desarrollo es *Bacillus amyloliquefaciens* no como tal el nematófago, lo cual indica que ese organismo en asociación y de manera individual es un fuerte antagonista para hongos fitopatógenos de importancia económica.

Abstract

The genus *Arthrobotrys* is a genus of ascomycetes described for the first time in 1839 by Corda (Liou, et al., 1997). Currently, this genus represents the largest group of nematophagous fungi, with an estimated 53 species (Jiang, et al., 2017). Within this genus, one of the most studied species is *Arthrobotrys oligospora* due to its potential as a biocontrol agent, it has a worldwide distribution, a short life cycle, a high reproduction rate, generates resistance structures for application in the field, and it is not pathogenic for humans, representing a friendly and viable alternative for its production, commercialization and application (Arroyo-Balán, et al., 2021).

Various studies have reported that this nematophagous has a symbiotic interaction with bacteria belonging to the *Stenotrophomonas* and *Rhizobium* suborders, enhancing the formation of traps formed by the fungus (Li et al., 2016). In this case, we worked with seven strains of *Arthrobotrys oligospora* isolated from the state of Querétaro (A6, A12, A13, R2-1, R2-6, R2-13 and R2-14) which had associated bacteria, we try to isolate and identify them to see if they belonged to any previously described genus associated with *A. oligospora* as well as to determine the impact that they have inhibiting or reducing of the growth of phytopathogens of importance in the agricultural sector.

The bacteria were identified as *Bacillus amyloliquefaciens*, Gram-negative bacilli, highly susceptible to antibiotics such as ampicillin, which despite having been isolated from different municipalities the municipalities of El Marques and Jalpan de Serra phylogenetic analyzes show that they are genetically very similar.

Antagonism assays demonstrated strong antagonism against *A. alternata* and *S. rolfsii*, moderate antagonistic activity against *F. oxysporum* and *C. gloeosporioides*, and minimal activity against *B. cinerea* and *R. solani*. Likewise, when removing the bacteria from *A. oligospora* and repeating the antagonism test, it was found that the organism that inhibits growth and development is *Bacillus amyloliquefaciens*, not the nematophagous, which indicates that this organism in association and alone is a strong antagonist for phytopathogenic fungi of economic importance.

1 Introducción

Los hongos nematófagos comprenden un gran grupo taxonómicamente heterogéneo, con organismos pertenecientes a los filos: *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota*, *Zygomycota* y *Oomycota* (De Freitas, et al., 2018). Los miembros pertenecientes a la familia Orbiliaceae del filo *Ascomycota*, representan el grupo más grande de hongos nematófagos, siendo el género *Arthrobotrys* el más representativo. Este cuenta con la mayor cantidad de especies descritas, actualmente con 200 registros en Mycobank (<https://www.mycobank.org>), de las cuales 53 especies se han documentado como nematófagos (Jiang, et al., 2017). Del género, *Arthrobotrys oligospora* es una de las especies más estudiadas, su genoma está secuenciado y disponible en la base de datos del Joint Genome Institute del Departamento de Energía de Estados Unidos de América (<https://mycocosm.jgi.doe.gov/Artol1/Artol1.home.html>).

Arthrobotrys oligospora produce un micelio en tonalidad rosa claro, o amarillo tenue, conidióforos generalmente no ramificados, conidios ovoides, con base apiculada y un septo que divide la célula en basal y distal, dándole forma de pera, las células son de tamaño desigual, siendo la célula basal más pequeña (Arroyo-Balán et al., 2021). Este hongo nematófago generalista, posee un gran potencial para el biocontrol de nemátodos en el sector agropecuario dado que posee un ciclo de vida corto, una alta tasa de reproducción, genera estructuras de resistencia para su aplicación en campo y sobre todo no es de carácter patógeno para humanos, representando así una alternativa amigable y viable para su producción, comercialización y aplicación (Arroyo-Balán, et al., 2021).

Los aislados con los que se trabajaron en este proyecto están determinados como cepas de *A. oligospora* variedad *queretana*, es decir, que están consideradas como un grupo muy relacionado, pero hasta el momento se desconoce si se trata de la misma especie o bien solo se encuentran genéticamente muy relacionadas (Arroyo-Balán et al., 2021), estas cepas cuentan con bacterias asociadas. Con el objetivo de determinar la importancia de estas bacterias en el desarrollo del hongo nematófago, así como en su capacidad para depredar nemátodos y sus posibles implicaciones biotecnológicas en sistemas de producción, estas fueron identificadas determinar que s no representen ningún riesgo para su aplicación tanto como método de biocontrol, como para el ser humano y el ecosistema, dado que pruebas de susceptibilidad a antibióticos han demostrado que las cepas de *A. oligospora* con las bacterias

asociadas son capaces de sobrevivir incluso en presencia de antibióticos como el cloranfenicol.

2 Antecedentes

2.1 Hongos nematófagos

Estos hongos son tan antiguos que se han encontrado fosilizados en ámbar que datan de 100 millones de años e incluso hacen referencia a estos en la edad del Cretácico (Devi, 2018).

Actualmente se han reportado más de 700 especies de hongos nematófagos (HN), distribuidos en los géneros: *Arthrobotrys*, *Cystopage*, *Dactylellina*, *Dactylella*, *Drechslerella*, *Hohenbuehelia*, *Hyphoderma*, *Monacrosporium*, *Nematoctonus*, *Orbilia*, *Stylopage*, *Tridentaria*, *Triposporina* y *Zoophagus*, sin embargo, los miembros pertenecientes a la familia Orbiliaceae, representan el grupo más grande de HN, con un estimado de 96 especies, *Arthrobotrys* (53 especies), *Dactylellina* (28 especies) y *Drechslerella* (14 especies) (Jiang, et al., 2017).

Estos hongos se encuentran ampliamente distribuidos tanto en ecosistemas acuáticos como terrestres, la mayoría de ellos poseen un estilo de vida saprofita al alimentarse de materia orgánica, aunque bajo condiciones nutrimentales desfavorables estos entran en su fase depredadora, sin embargo, existen algunas especies que actúan como parásitos obligados, pues dependen por completo de la presencia de nematodos para sobrevivir.

Reciben el nombre de hongos nematófagos, dado que poseen la capacidad de atrapar, matar y extraer nutrientes a partir de los nematodos. Con base en su método de depredación estos hongos se han clasificado en tres grupos: endoparásitos, oportunistas u ovívidos y atrapa-nematodos/depredador (De Freitas, et al., 2018).

2.2 Endoparásitos

A diferencia de los hongos depredadores, estos hongos actúan más como parásitos obligados, debido a que suelen tener un rango restringido de huéspedes. Su método de infección consiste en emplear conidios que pueden adherirse directamente a la superficie de los nematodos, o bien pueden ser ingeridas por los huéspedes (Dijksterhuis, et al., 1994). Algunos endoparásitos, producen zoosporas, las cuales se adhieren y enquistan en la superficie de la cutícula (Herrera-Estrella, et

al.,2016). Las esporas se adhieren a la cutícula, cabeza y poro genital del nematodo, posteriormente una hifa infectiva penetra la pared del cuerpo, formando hifas que comienzan a crecer y a degradar el interior del nematodo (Dai, et al., 2022).

Por otra parte, la invasión por parte de las esporas consiste en cuatro pasos: ingesta de las esporas, parasitismo, germinación y penetración, todo comienza cuando un nematodo consume las esporas, algunas de estas se van adhiriendo en la parte interna del gusano para posteriormente germinar y dar lugar a hifas que comienzan a crecer a través del cuerpo, matando al nematodo en menos de 48 horas mientras es digerido; las hifas que yacen en la superficie continúan creciendo hasta cubrir por completo el cadáver, cerrando el ciclo de vida con la producción de nuevas esporas (Dai, et al., 2022). Se han reportado más de 70 especies y 22 géneros como: *Harposporium*, *Drechmeria*, *Esteya*, entre otros, que pertenecen a esta clasificación (Wang et al., 2008).

Drechmeria coniospora, es un hongo nematófago endoparásito, el cual pertenece a la familia Clavicipitaceae, este emplea esporas adhesivas como mecanismo de infección contra una amplia variedad de nematodos incluidos nematodos formadores de agallas en la alfalfa y el tomate (Wan, et al., 2021).

2.3 Oportunistas/ ovidas

Estos hongos poseen la capacidad de parasitar huevos, quistes y hembras de nematodo, volviéndolos una de las mejores alternativas de biocontrol, dada la reducción que existe en los niveles de huevos viables en el suelo (Herrera-Estrella, et al.,2016).

Resultan ser oportunistas, pues no dependen de la presencia del parásito en el suelo para sobrevivir. Su mecanismo de acción es mediante el crecimiento interno de hifas vegetativas (Dijksterhuis, et al.,1994), estas pueden penetrar en la cáscara del huevo a través de los poros de la capa vitelina, provocando cambios en la permeabilidad de la cáscara y expandiendo su volumen para que posteriormente las hifas se muevan a través de la capa adyacente de quitina y lípidos, colonizando así el interior del huevo y las larvas en desarrollo (Herrera-Estrella, et al.,2016). Este grupo comprende algunas especies pertenecientes a los géneros: *Pochonia*, *Trichoderma*, *Paecilomyces* y *Dactylella* (Herrera-Estrella, et al.,2016).

2.4 Depredadores o atrapa nematodos

Este grupo es el más estudiado ya que poseen un ciclo de vida saprofita y depredador, comprende a los géneros *Arthrobotrys*, *Duddingtonia* y *Monacrosporium*, los cuales poseen la mayoría de especies utilizadas para control biológico (Herrera-Estrella, et al.,2016).

Estos presentan la capacidad de generar seis diferentes tipos de estructuras extracelulares que pueden ser o no de carácter adhesivo: columnas adhesivas, redes adhesivas tridimensionales, botones adhesivos, anillos de constricción y anillos no restrictivos (Herrera-Estrella, et al.,2016).

La formación de trampas es de suma importancia para los hongos nematófagos, dado que les permite cambiar a un comportamiento parasitario y capturar nematodos. Las trampas son inducidas por la presencia directa de nemátodos o bien por algunas de sus moléculas secretadas como aminoácidos o lípidos y se desarrollan a partir de ramificaciones de hifas, denominándose trampas miceliales (TM). Así mismo, las trampas pueden formarse directamente sobre la germinación de las esporas, es decir, sin pasar por una fase micelial intermedia o sobre las hifas de germinación, dando lugar a trampas conidiales (TC), las cuales están asociadas a la privación de nutrientes (Li, et al.,2011).

2.5 Tipos de trampas

2.5.1 Anillo constrictor

Los anillos constrictores fueron descritos por primera vez en 1937 por Dreschsler, este tipo de trampa consiste en la generación de un anillo formado por tres células curvas, con una de ellas conectada a la hifa parental mediante un tallo conformado por las otras dos células; estos anillos se van desarrollando a lo largo de las hifas, siendo el tallo, el responsable de permitir que el anillo se encuentre elevado y de manera perpendicular al filamento del hongo, aumentando así la probabilidad poder depredar nematodos (Liu, et al., 2012). Estos anillos permanecen inactivos hasta que un nematodo pasa a través de este, en ese momento los receptores acoplados a proteína G presentes en la superficie interna del anillo, desencadenan una cascada de señalización que involucra al adenosin monofosfato cíclico (cAMP), al inositol-1-4-5- trifosfato (IP3) y Ca^{2+} (Liu, et al., 2014), regulando que las células que conforman el anillo tripliquen su volumen en un tiempo aproximado de 0.1

segundos inmovilizando al nematodo (Herrera-Estrella, et al., 2016). Cuando el nematodo se encuentra inmovilizado, es penetrado por una hifa que comienza a crecer desde la superficie de las células del anillo al interior del nematodo formando un bulbo de infección, el cual comienza a digerir y absorber el interior de la presa (Devi, 2018). Los anillos constrictores poseen un diámetro exterior de aproximadamente 30 μm , mientras que el diámetro de la abertura es de aproximadamente 20 μm (Liu, et al., 2012).

Las células que conforman el anillo constrictor, poseen una pared celular plegada, sin embargo, cuando estas se inflan, la pared se despliega dando lugar a una nueva pared celular (Herrera-Estrella, et al., 2016).

Dentro del género *Drechslerella*, podemos encontrar especies nematófagas como *Drechslerella doedycoides* y *Drechslerella stenobrocha*, las cuales desarrollan anillos constrictores para capturar nematodos de manera activa (Lui, et al., 2014). Si bien, el anillo se contrae sumamente rápido, el nematodo aún puede escapar si posee un diámetro similar al del anillo, como es en el caso de *Drechslerella doedycoides*, quien generalmente atrapa las primeras etapas larvares de los nematodos, de manera que pueden escapar de las trampas dado al breve retraso entre la entrada y el cierre del anillo y su tamaño pequeño y angosto (Herrera-Estrella et al., 2016).

Aunque el contacto directo de los anillos con el nematodo es el principal estímulo para activarlos, existen diferentes estímulos que también pueden inducir la contracción de estos como, por ejemplo: agua caliente, presión, electricidad o bien un incremento de Ca^{2+} intracelular (Liu, et al., 2012).

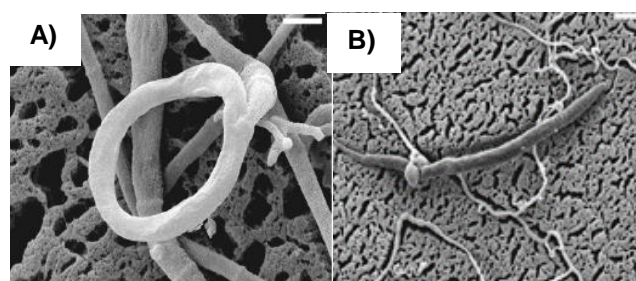


Figura 1. Anillo constrictor de hongos nematófagos. A) Morfología de un anillo constrictor. **B)** Nematodo capturado por un anillo constrictor después de que las células del anillo aumentaran su volumen (Imagen tomada de Liu, et al., 2014).

2.5.2 Columnas/ramas adhesivas

Las columnas o ramas adhesivas se caracterizan por ser estructuras de una o tres células que se van formando de manera erecta a partir de una hifa, estas células poseen la capacidad de secretar un polímero adhesivo (Su, et al., 2017). Los nematodos son capturados al entrar en contacto con el adhesivo de estas ramas, generalmente la disposición de las columnas es conjunta, de manera que más de una rama entrará en contacto con el nematodo impidiendo que este pueda escapar (Al-Hakeem, et al., 2022), una vez que este es capturado, cada columna comienza a penetrar al gusano formando bulbos de infección (Quevedo, et al., 2022). Hongos como: *M. cionopagum* (Su, et al., 2017) y algunas especies del género *Gamsylella* son capaces de generar este tipo de trampas (Quevedo, et al., 2022).

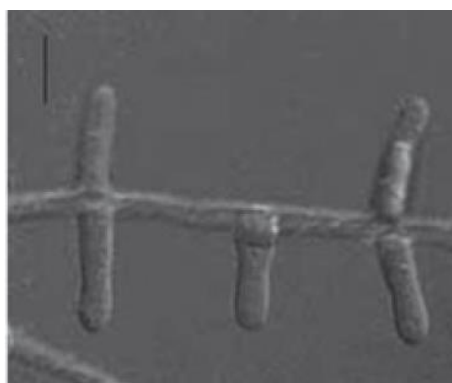


Figura 2. Columnas adhesivas de hongos nematófagos. A) Estructura de tres columnas adhesivas del hongo *M. cionopagum* (Imagen tomada de Su, et al., 2017).

2.5.3 Anillos no constrictores

Los anillos no constrictores, son trampas que se forman a partir de una ramificación lateral erecta proveniente de una hifa vegetativa que se espesa y se va curvando hasta formar un anillo, que al igual que el constrictivo, está conformado por tres células, sin embargo, este no posee la capacidad adhesiva (Liu, et al., 2009), estos llegan a tener un diámetro aproximado de 20-50 micras (Pérez, 2014). Es considerado que este tipo de trampa evolucionó a partir de los botones adhesivos y es por eso que estas trampas siempre van acompañadas de botones o protuberancias adhesivas (Su, et al., 2017). Los hongos que cuentan con este tipo de trampa, atrapan a los nematodos de manera indirecta, ya que estos se ven enredados en la estructura, así mismo, emplean los botones adhesivos para propagarse, ya que estos pueden

desprenderse para adherirse al nematodo y viajar con el (Liu, et al., 2009). Dentro del género *Dactylellina*, podemos encontrar especies como *Dactylellina leptospora* y *Dactylellina haptotyla* capaces de producir estos anillos no constrictores en conjunto con los anillos adhesivos (Zhang, et al., 2020)

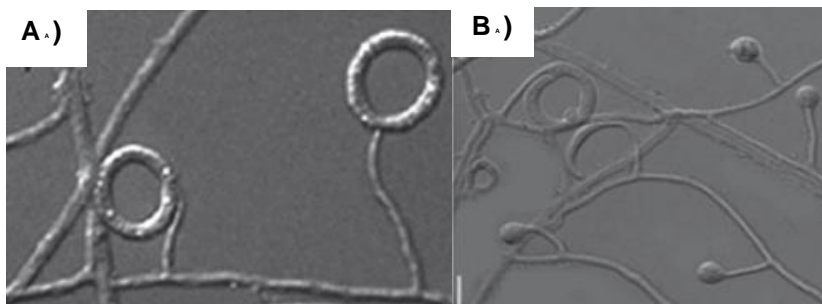


Figura 3. Anillos no constrictores de hongos nemátofagos. A) Estructura de anillos no constrictores del hongo nematófago *Meloidogyne lysipagum*. **B)** Anillos no constrictores acompañados de botones adhesivos de *M. candidum*. Imagen tomada de Su, et al., 2017.

2.5.4 Botones adhesivos

Los botones adhesivos son considerados como un tipo de trampa ancestral, es decir, que a partir de esta se derivaron tanto las redes tridimensionales como los anillos constrictores y no constrictores (Devi, 2018). En este caso, las hifas poseen células globosas o subglobosas las cuales pueden ser sésiles o bien pueden tener un tallo el cual da lugar a un botón adhesivo. Este botón se desprende del micelio para adherirse a un nematodo, penetrar su cutícula e infectarlo. Una vez que el nematodo es infectado el botón da lugar a un bulbo de infección, el cual prolifera dentro del cuerpo del nematodo y comienza a digerirlo poco a poco para asimilar los nutrientes; una vez que el nematodo muere, las hifas emergen del cuerpo dando origen a un nuevo micelio (Devi, 2018). Dentro del género *Dactylellina* podemos encontrar especies como *Dactylellina ellipsospora*, *Dactylellina drechsleri* capaces de producir botones adhesivos y *Monacrosporium lysipagum* capaz de producir tanto botones adhesivos como anillos no constrictores (Su, et al., 2017).



Figura 4. Botones adhesivos de hongos nematófagos. Estructura de botones adhesivos del hongo nematófago *Monacrosporium ellipsosporum*. Imagen tomada de Su, et al., 2017.

2.5.5 Redes adhesivas

Para la formación de este tipo de redes, la hifa vegetativa comienza a formar una rama lateral erecta, la cual se va curvando hasta fusionarse con la hifa parental, posteriormente comienzan a desarrollar apresorios que van a penetrar al nematodo enredado, comenzando la formación de un bulbo e hifas de infección que comenzaran a degradar y digerir el interior de la presa (Devi, 2018).

Este tipo de red está cubierta por una capa de polímeros extracelulares fibrilares, los cuales están compuestos principalmente de proteínas y carbohidratos, de manera que cuando se adhieren a la presa estos se vuelven más densos y pueden reorganizarse hacia una dirección en específico para unirse a la cutícula del nematodo (Xue et al., 2011). Cuando el hongo se adhiere a la cutícula del nematodo comienza a desarrollar un tubo que le permite perforarla paralizando al nematodo. Posteriormente las hifas se extienden hasta colonizar y digerir los tejidos internos (Herrera-Estrella, et al., 2016).

Dentro de esta clasificación podemos encontrar especies de géneros como *Duddingtonia*, *Arthrobotrys*, *Nematoctonus*, *Monacrosporium*, entre otros, que emplean la formación de estas redes adhesivas tridimensionales para capturar nematodos (Maciel, et al., 2009). Hongos nematófagos como *Duddingtonia flagrans* se han empleado como agentes de control biológico para el control de las etapas de vida libre de *Ancylostoma spp.*, que es considerado un parásito que afecta animales domésticos como los perros (Maciel, et al., 2009).

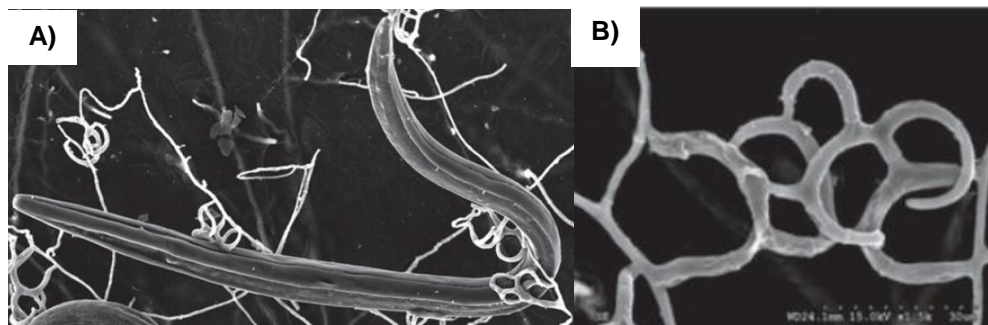


Figura 5. Redes adhesivas de hongos nematófagos. A) Nematodo *Caenorhabditis elegans* capturado por el hongo nematófago *Arthrobotrys oligospora*. **B)** Estructura de red adhesiva de *A. oligospora*. Imagen tomada de Su, et al., 2017.

2.6 Género *Arthrobotrys*

El género *Arthrobotrys*, es un género de ascomicetos descrito por primera vez en 1839 por Corda, bajo la necesidad de describir una nueva especie: *Arthrobotrys superba* (Liou et al., 1997). En aquel entonces, Corda describió los conidióforos de *Arthrobotrys* como simples, erectos y septados, y los conidios como bicelulares con una base apical sin embargo, la necesidad de incluir nuevas especies llevo a dividir al género en tres: 1) "superba", con conidióforos nodulares y conidios piriformes; 2) "oligospora", con conidios piriformes y 3) otros que no fueron nombrados, pero se distinguían por sus conidióforos ramificados (Haard, 1968). Poco después para la identificación de nuevas especies pertenecientes a este género se usaron las claves de Cooke & Godfrey, 1964, un escrito con más de 97 claves ilustradas de lo que se denominaban como hongos destructores de nematodos.

Actualmente, este género representa el grupo más grande de HN, con un estimado 53 especies (Jiang, et al., 2017). Este grupo de hongos es antagónico, parásito y depredador y pueden desarrollar varias estructuras de depredación micelial, como redes adhesivas tridimensionales o apresorios (Doolotkeldieva, et al., 2021).

2.7 *Arthrobotrys oligospora*

A. oligospora, fue colectado y descrito por primera vez en 1852 en Europa por Fresenius, quien pensaba que este hongo únicamente presentaba un estilo de vida saprobio, pues se alimentaba de materia orgánica en descomposición. Casi veinte años después, en 1870, Woronin, encontró que *A. oligospora* era capaz de desarrollar una estructura especializada tipo red, la cual se formaba a partir de una ramificación lateral erecta de una hifa vegetativa, la cual se iba curveando hasta fusionarse con la hifa parental para después generar bucles. Sin embargo, la función de esta estructura se desconocía por completo, hasta que en 1876, Sorokin reportó que estos bucles o

anillos como él los llamó, eran capaces de infectar nematodos y por ende no se trataba de un hongo saprobio, sino de un hongo parasítico aún cuando el mecanismo mediante el cual *A.oligospora* era capaz de afectar nematodos permaneció desconocida hasta 1888. En 1888, el botánico alemán Friederich Wilhelm demostró que esa estructura especializada, únicamente se formaba cuando existía una deficiencia de nutrientes y no solo afectaba nematodos, si no que los capturaba, penetraba su cutícula para invadirlo y comenzaba a crecer desde el interior para finalmente matarlos y digerirlos; una vez que consumía su presa las hifas emergían del cadáver para completar su ciclo de vida mediante la formación de conidióforos y la dispersión de conidios (Xue et al., 2011).

Tomando en cuenta lo anterior, *A. oligospora* es considerado como uno de los hongos nematófagos más predominantes dada su capacidad para encontrarse a lo largo de todas las temporadas del año en diferentes ambientes, así como estar presente en heces de animales domésticos como salvajes de diferentes regiones(Xue et al., 2011). Además de las características depredadoras de *A. oligospora*, este hongo posee otras ventajas en relación a su corto ciclo de vida, su alta tasa de reproducción, sus esporas resistentes y su capacidad para tener una fase saprobia (Arroyo-Balán, et al., 2021), que volvieron a esta especie un excelente modelo para el estudio del género *Arthrobotrys* y sobre todo para el estudio de hongos nematófagos.

2.7.1 Generalidades de *A. oligospora*

Arthrobotrys oligospora, es un hongo nematófago de distribución mundial, se ha reportado en continentes como Asia, América, África y Oceanía y en distintos tipos de ambientes desde suelo, heces, cuerpos de agua, hasta suelos contaminados con metales pesados (Xue et al.,2011).

A.oligospora presenta un micelio en tonalidad rosa muy claro, o amarillo tenue, conidióforos generalmente no ramificados, conidios ovoides, con base apiculada y un septo que divide la célula en basal y distal, dándole esta forma de pera; las células son de tamaño desigual, siendo la célula basal más pequeña (Arroyo-Balán et al., 2021)

Las células que dan lugar a la formación de trampas se diferencian de las células hifales típicas porque presentan organelos denominados cuerpos densos, los cuales poseen la única habilidad de capturar nematodos; estos organelos comienzan a desarrollarse en las etapas iniciales de la formación de trampas (Xue et al.,2011).

El origen de estos organelos sugiere que eran de naturaleza peroxisomal dado que tienen actividad de catalasa y D-aminoácido oxidasa, actualmente se sugiere que desempeñan un papel en el suministro de energía o como componentes estructurales en las hifas invasoras (Xue et al.,2011).

A. oligospora es un hongo nematófago capaz de formar redes tridimensionales para capturar nematodos, hasta el momento, análisis transcriptómicos han demostrado que durante el proceso de formación de trampas están involucradas las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), reguladores de la señalización de la proteína G y algunas GTPasas de la familia Ras y Rab, demostrando la complejidad de este proceso dado la cantidad de proteínas y vías de señalización involucradas este proceso requiere de un gran gasto energético dado todos los procesos que están involucrados como el metabolismo de carbohidratos, aminoácidos y lípidos, aunado a la biosíntesis, transporte y catabolismo de metabolitos secundarios y procesos celulares involucrados con los peroxisomas y los fagosomas. Así mismo, *A. oligospora* posee unos ortólogos (AoRho2, AoCdc42, and AoRac) a las proteínas Rho, las cuales están directamente involucradas en la ramificación del micelio, resistencia a procesos de oxidación e hiperosmosis, así como en la síntesis de la pared celular, producción y morfología de las esporas, formación de trampas, actividad nematocida y la producción de especies reactivas de oxígeno (Yang, et al., 2022).

2.8 Biocontrol de hongos fitopatógenos

2.8.1 Hongos fitopatógenos

Los hongos fitopatógenos son aquellos capaces de generar enfermedades en plantas a través de moléculas denominadas factores de virulencia que pueden ser enzimas, metabolitos secundarios e incluso pequeñas moléculas de ARN si bien la mayoría de estas especies patógenas se encuentran en los filos Ascomycota y Basidiomycota, se dividen en dos grupos principales: los patógenos biotróficos, que son aquellos que forman interacciones íntimas con las plantas y pueden utilizar los tejidos vivos y los patógenos necrotróficos, que matan el tejido para poder extraer nutrientes (Doehlemann, et al., 2017).

2.8.1.1 Hongos biotróficos

Los hongos biotróficos, son aquellos capaces de penetrar la pared celular de su hospedero para poder absorber nutrientes mediante una estructura especializada conocida como “haustorio” sin generar una alteración en la membrana plasmática de

las células de las plantas (Fei, et al., 2023), estos pueden ser ya sea de carácter obligado o bien no obligado (Doehlemann, et al., 2017). El mecanismo de infección empieza cuando el fitopatógeno secreta enzimas líticas para alterar la pared celular de su huésped, posteriormente metabolitos secundarios y factores de virulencia comienzan a interactuar y a destruir las células inmunes del huésped para así poder propagar la infección, los haustorios comienzan a crecer hasta alcanzar la membrana plasmática del huésped establecer por completo la infección y colapsar el sistema de la planta huésped (Fei, et al., 2023).

Dentro de esta categoría podemos encontrar especies del género *Claviceps* como *Claviceps purpurea*, esta especie es capaz de afectar a una gran variedad de hierbas y plantas como por ejemplo el centeno, este fitopatógeno suele iniciar la infección mediante ascosporas transportadas por el viento que germinan en la superficie del pistilo de las flores o bien en alguna superficie de la planta, posteriormente inicia la penetración a través de los pelos estigmáticos, para el alcanzar, colonizar el tejido ovárico y establecer una interfaz huésped-patógeno específica y persistente (Doehlemann, et al., 2017).

2.8.1.2 Hongos necrotróficos

Los hongos necrotróficos obtienen sus nutrientes a partir de las células muertas de las plantas, esto sucede cuando el hongo comienza a necrosar el tejido de las plantas a través de la producción y secreción de enzimas y metabolitos secundarios que se encargan de degradar la pared celular y a su vez actúan como toxinas y/o efectores (Faris, et al., 2020). Esta clase de fitopatógeno puede ser clasificado como especialista, es decir que tienen un rango o un huésped en particular al que pueden afectar dadas las toxinas o efectores necrotróficos que producen, por otro lado, están los generalistas que son capaces de afectar una gran variedad de especies (Faris, et al., 2020). Dentro de esta categoría podemos encontrar especies del género *Botrytis*, *Alternaria*, *Sclerotinia* entre otros como *Botrytis cinerea*, patógeno de gran importancia económica dentro del área de la viticultura, *B. cinerea* aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno aprovechando el estrés oxidativo para poder establecerse y poder comenzar a generar una zona de tejido muerto (necrótico) en la que cual se encuentra protegido del sistema de defensa del huésped y asu vez podrá alimentarse para posteriormente propagar la necrosis (Doehlemann, et al., 2017).

2.9 Métodos convencionales de control

El sistema de manejo del cultivo-plaga-ambiente se basa en los principios de exclusión, erradicación y protección, para lograr esto se emplean métodos de control químicos, físicos, biológicos y culturales de manera integrada (Aguilar-Marcelino, et al.,2020).

2.9.1 Control cultural

Los cultivos intercalados, son una de las prácticas culturales más empleadas, esta práctica hace referencia a sembrar diferentes cultivos al mismo tiempo, esto para disminuir la probabilidad de presencia de alguna plaga y aumentar el aprovechamiento de los nutrientes del suelo (FAO, 2000).

En México, el cultivo intercalado de la planta caléndula en conjunto con el jitomate ha mostrado una disminución en la presencia de la enfermedad del tizón temprano, causada por el fitopatógeno *Alternaria solani* en el jitomate; esto dado que actúa como barrera física contra la propagación de conidias, así mismo, existe un efecto alelopático de la caléndula en la germinación de conidios de *A. solani*, es decir, la caléndula permite generar un cambio en las condiciones microclimáticas reduciendo el número de horas por día con una humedad relativa de $\geq 92\%$, dando como resultado una disminución en el desarrollo de conidias (Aguilar-Marcelino, et al.,2020)

2.9.2 Control químico

Se define como pesticida al grupo de sustancias químicas que comprende insecticidas, fungicidas, herbicidas, nematocidas, molusquicidas, entre otros, los cuales se emplean en cultivos agrícolas para protegerlos de plagas, así como para nutrirlos, aumentar su rendimiento y eficiencia (Rani, et al., 2021).

Si bien, estas sustancias se usan desde hace poco más de 4500 años para protección de los cultivos, se estima que al menos al 2021 cerca de tres mil millones de kilogramos de pesticidas se usaron a nivel mundial, sin embargo, únicamente el 1% del total de pesticidas ejerció su efecto sobre la plaga deseada en el cultivo de interés, el resto penetró plantas, insectos, medios ambientales que no eran el objetivo, dando como resultado una contaminación ambiental, puesto que la degradación de muchos de estos pesticidas solo dió origen a nuevos químicos (Tudi, et al., 2021). Aunado a esto, los trabajadores que se encargan de aplicar estos productos suelen presentar efectos secundarios en la salud tales como: cáncer, daño en el ADN,

trastornos neurológicos, así como problemas efectos respiratorios, metabólicos y tiroideos dado la exposición a pesticidas (Curl, et al., 2020)

2.9.3 Control biológico

El control biológico, mejor conocido como biocontrol es una estrategia de manejo integrado de plagas, en el cual se busca la reducción o eliminación de plagas o patógenos mediante el empleo de uno o más organismos tales como: hongos, bacterias, insectos e incluso virus o bien de moléculas o compuestos activos aislados a partir de estos organismos (Kumar et al., 2021). A lo largo de la última década, la problemática con plagas en cultivos ha ido en aumento dado que estas han desarrollado resistencia a la mayoría de los pesticidas comerciales (Aguilar-Marcelino, et al., 2020).

Para que el método de biocontrol sea efectivo es necesario considerar factores relacionados con la ecología, fisiología, pero sobre todo el ciclo de vida de los organismos involucrados ya que lo que se busca es que el organismo que va actuar como agente de biocontrol sea específico de nuestra plaga de interés para evitar que este pudiera afectar a otros organismos del ecosistema.

2.9.4 Uso de hongos nematófagos como agentes de biocontrol

Hoy en día, la mayoría del control de nematodos se lleva a cabo mediante el rocío de nematicidas químicos, principalmente pesticidas organoclorados y organofosforados, los cuales incluyen compuestos volátiles y semivolátiles (Woodrow, et al., 2021) los cuales han resultado ser altamente peligrosos para la salud humana dependiendo de si la exposición es mediante ingesta, inhalación o absorción dérmica (Suratman, et al., 2015) y para el medio ambiente, dado que estos prevalecen en el ambiente por periodos largos y desarrollan resistencia en los nematodos.

Tomando en cuenta lo anterior, los hongos nematófagos, son considerados como uno de los principales enemigos naturales de los nematodos, dado que ejercen un control biológico sobre sus poblaciones y se pueden encontrar en una amplia variedad de ambientes (Herrera-Estrella, et al., 2016), posicionándolos como una excelente estrategia de control biológico de nematodos que parasitan tanto las plantas como los animales. Por ejemplo, dentro del orden de los Orbiliales podemos encontrar especies nematófagas como *Arthrobotrys oligospora* capaz de generar trampas adhesivas o *Drechslerella stenobrocha* la cual desarrolla anillos constrictores, así

mismo *Hirsutella minnesotensis*, endoparasita principalmente nematodos del quiste de la soja (Zhang, et al., 1016)

2.9.5 Uso de bacterias como agentes de biocontrol

Desde las últimas dos décadas, el uso de bacterias como agentes de biocontrol se ha convertido en una de las estrategias más prometedoras para combatir distintos patógenos, especialmente de plantas. Actualmente se sabe que muchas de las bacterias que se encuentran en el suelo, principalmente alrededor de las raíces de las plantas poseen la capacidad de promover el crecimiento de las plantas, por lo cual se les denomina como bacterias promotoras del crecimiento de las plantas (Olanrewaju, et al., 2017), dentro de esta categoría podemos encontrar diferentes especies pertenecientes a los géneros: *Arthrobacter*, *Enterobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Streptomyces*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Klebsiella*, *Burkholderia*, que además suelen presentar también una actividad antagonista contra ciertos patógenos presentes en el suelo (Saber Riseh, et al., 2021). Por ejemplo, desde hace ya varios años se han empleado diferentes cepas de *Bacillus cereus* para controlar al hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum*, un patógeno que ataca a la planta del jitomate y causa grandes pérdidas económicas en México, en este caso *B.cereus*, actúa de manera antagónica liberando enzimas como proteasas, quitinasas, glucanasas, celulasas entre otras, así como compuestos volátiles, todo esto mientras promueve de igual manera y desencadena una resistencia sistémica inducida en la planta frente al patógeno (Ramírez, et al., 2022).

2.10 Simbiosis hongo-bacteria

Las interacciones simbióticas juegan un papel muy importante a nivel ecológico y biológico en las funciones de los huéspedes ya que los simbioses se pueden ver directamente involucrados en la nutrición del huésped, así como en procesos de reproducción, comportamiento e incluso de protección frente a parásitos, depredadores y patógenos (Wang, et al., 2017).

Hoy en día se sabe que los organismos eucariotas albergan una gran cantidad de microorganismos asociados, como es el caso de los hongos, los cuales poseen su propia microbiota en la superficie o en el interior de sus hifas como es el caso de las bacterias auxiliares de micorrizas (Proteobacteria, Oxalobacteraceae, Actinomycetes y Firmicutes) o algunas endobacterias, un claro ejemplo es la bacteria *Rhizophagus*

irregularis que como parte de su metabolismo secreta fructosa la cual estimula la expresión y secreción de la fosfatasa en el hongo *Rahnella aquatilis* promoviendo así la mineralización de fósforo orgánico en fosforo inorgánico (Bonfante, et al., 2019).

Por otra parte, las endobacterias citoplasmáticas, son consideradas la interacción hongo bacteria más especializada, dado que las bacterias perdieron la capacidad de vivir de manera independiente, resultando en una reducción de su genoma y una adaptación para poder completar sus ciclos de vida dentro del citoplasma del hongo (Bonfante, et al., 2019).

La mayoría de los hongos que poseen una relación simbiótica con bacterias pertenecen a los filos: Glomeromycota y Zygomycota, aunque recientemente hongos septados pertenecientes a Ascomycota y Basidiomycota han reportado tener endobacterias presentes como es el caso de *Tuber borchii* y *Sebacinales* respectivamente (Wang, et al., 2017).

Se ha descrito que las bacterias forman biofilms sobre diversos hongos y sus estructuras, algunos ejemplos reportados son *Pseudomonas* con *Candida*, hongos micorrízicos con bacterias auxiliares de micorriza, *Salmonella* con *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis* con *Aspergillus niger*, entre otros (Li et al., 2016). Aunque se sabe que estas interacciones resultan benéficas para ambos organismos, los factores bacterianos involucrados en la unión de las bacterias a las hifas aún no se encuentran completamente caracterizados.

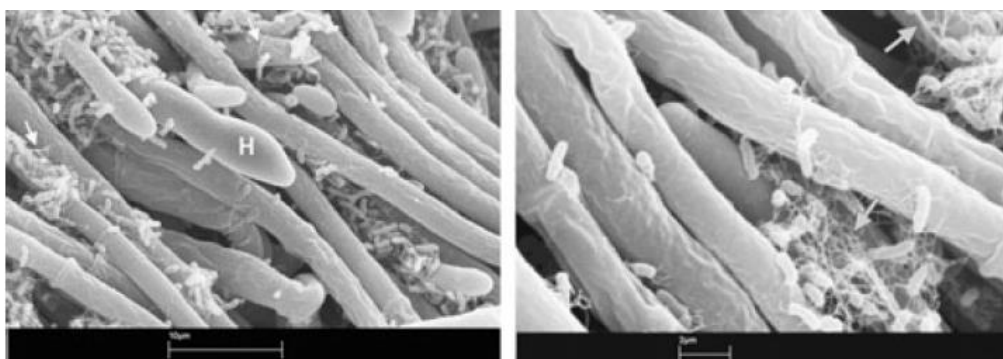


Figura 6. Simbiosis bacteria hongo. Micrografía electrónica de barrido que muestran una simbiosis bacteria hongo, en este caso, las bacterias se encuentran unidas a hifas y conidios de una cepa silvestres de *Fusarium oxysporum* (Minerdi, et al., 2008)

Al día de hoy, se sabe poco acerca de endosimbiontes presentes en hongos usados para biocontrol, principalmente en hongos nematófagos, sin embargo, Wang

y colaboradores en 2017, comprobaron que un hongo septado, *Esteya Vermicola*, presentaba endosimbiontes en el citoplasma, estas bacterias pertenecientes a la clase de Gammaproteobacterias, fueron reportadas como *Pseudomonas* spp, se transmitían de manera vertical de una generación a otra mediante la esporulación y juegan un papel muy importante al producir y secretar enzimas requeridas para la adhesión y penetración al cuerpo del nematodo aumentando así su actividad nematocida y su éxito como agente de biocontrol.

2.11 Bacterias asociadas con *A. oligospora*

En 1987 Rucker y Zachariah, realizaron un estudio en el cual se encontró que varias bacterias presentes en la rizosfera potenciaban la formación de trampas en *A. oligospora* en contra del nematodo agallador *M. mayaguensis*, se sugirió que estas bacterias producían sustancias tales como exopolisacaridos o algunos compuestos tóxicos que reducían la movilidad de las larvas juveniles o incluso producían puentes de azúcares simples que actuaban como conectores moleculares potenciando la especificidad del hongo nematófago hacia su presa, de ahí que hayan recibido el nombre de bacterias ayudadoras de hongos nematófagos o bien bacterias helper (Duponnois, et al., 1998).

Así mismo, en China, se encontraron que algunas bacterias presentes en excremento de vaca como *Stenotrophomonas* eran capaces de inducir la formación de trampas en *A. oligospora*, mediante la liberación de urea (Wang, et al., 2014). La urea, al presentar una alta tasa de solubilidad y rápida difusión, se propaga hasta internalizarse en las células del hongo y actúa como molécula señalizadora al ser metabolizada en dióxido de carbono y amonio, componentes que finalmente desencadenan el cambio de su fase saprofita a depredadora (Wang, et al., 2014).

Si bien, ya se tenían registros de la interacción de bacterias “helper” con *A. oligospora*, no fue hasta 2016 cuando Li y colaboradores presentaron la primera evidencia de una asociación íntima entre bacterias presentes en el suelo pertenecientes al suborden de *Stenotrophomonas* y *Rhizobium* con *A. oligospora*, estas bacterias se encontraban adheridas a la superficie de las hifas formando una estructura similar a la de un biofilm y producían dicepiperazinas, en especial la Cyclo(L-Leu-trans-4-hydroxy-L-Pro) [C(L-Leu-Pro)] potenciaba la unión polar de las bacterias hacia las hifas y generaba un incremento en la cantidad de trampas formadas por parte del hongo nematófago. Sin embargo, es necesario tener en cuenta

que factores abióticos como el pH, temperatura, nivel nutricional y compuestos como el nemi, péptidos pequeños, aminoácidos, urea, amoníaco y ascarósidos, pueden afectar la formación de trampas en *A. oligospora* (Li et al., 2016).

3 Justificación

Los programas de control biológico contemplan el uso de enemigos naturales para el control de patógenos que afectan los sistemas de producción y salud pública. Una característica importante del biocontrol es la utilización de organismos amigables para el ambiente, su compatibilidad con otros métodos de control y que difícilmente el patógeno desarrolla resistencia al biocontrolador. *Arthrobotrys oligospora* es un hongo generalista, con la capacidad de controlar una amplia gama de nemátodos de importancia económica en el sector agropecuario.

Los hongos nematófagos frecuentemente se encuentran asociados a bacterias que potencian su capacidad depredadora. De manera interesante, los aislados de *A. oligospora* nativos del estado de Querétaro se encuentran asociados de forma natural con bacterias. Por lo tanto, es importante identificar las bacterias asociadas y analizar su función en la biología del hongo y el posible impacto como agente de biocontrol.

4 Hipótesis

Los aislados del hongo *Arthrobotrys oligospora* nativos del estado de Querétaro poseen especies bacterianas asociadas a géneros previamente reportados en hongos nematófagos las cuales son capaces de inhibir o reducir el crecimiento de fitopatógenos como: *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botrytis cinerea*, *Sclerotium rolfsii* y *Rhizoctonia solani*.

5 **Objetivo general**

Aislar e identificar las bacterias asociadas a los aislados de *Arthrobotrys oligospora* nativos del estado de Querétaro para determinar su posible impacto como agentes de biocontrol.

6 **Objetivos específicos**

1. Aislar las cepas bacterianas asociadas de *A. oligospora* variante. *queretana*.
2. Caracterizar mediante tinción de Gram y pruebas bioquímicas las bacterias aisladas
3. Identificar de manera molecular las bacterias previamente aisladas.
4. Eliminar las bacterias asociadas a las cepas de *A. oligospora* y demostrar de manera molecular su ausencia.
5. Observar el potencial antagónico in vitro de las bacterias asiladas contra los fitopatógenos *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botrytis cinerea*, *Sclerotium rolfsii* y *Rhizoctonia solani*.
6. Observar si las cepas de *A. oligospora* asociadas con las bacterias presentan el mismo potencial antagónico in vitro contra los fitopatógenos *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botrytis cinerea*, *Sclerotium rolfsii* y *Rhizoctonia solani* en comparación con las cepas de *A. oligospora* que ya no poseen bacterias asociadas.

7 Materiales y métodos

7.1 Cepas y condiciones de cultivo

Se utilizaron siete cepas de *Arthrobotrys oligospora* colectadas en 2018 de Querétaro en los municipios de El Marqués y Jalpan de Serra (Arroyo-Balán F, et al., 2021). Las cepas A6, A12, A13, R2-1, R2-6, R2-13 y R2-14 se sembraron en medio de cultivo Agar de Dextrosa y Papa (PDA), durante 1 semana a 28°C para posteriormente colectar los conidios y almacenarlos a 4°C, hasta su posterior uso. Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a una presión de 15 libras a una temperatura de 121°C durante 15 minutos. La manipulación de los hongos y bacterias se realizó bajo condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar.

7.2 Inhibición de crecimiento fúngico con benomilo

Se utilizaron siete cepas de *Arthrobotrys oligospora* colectadas en 2018 en los municipios de El Marqués y Jalpan de Serra en Querétaro. Las cepas A6, A12, A13, R2-1, R2-6, R2-13 y R2-14 se propagaron en medio PDA, durante 1 semana a 28°C para posteriormente colectar las esporas y almacenarlas a 4°C. Se hicieron diluciones hasta tener 1500 conidios de cada cepa y obtener un crecimiento homogéneo.

Se prepararon placas de medio de cultivo PDA suplementadas con 0, 1, 2, 3 y 4 µg/ml de benomilo de uso agrícola (Promyl®, PTI) y se inocularon en el centro de la placa con gotas de 10 µl con 1500 conidios. Los cultivos se incubaron a 28°C durante 5 días y se fotografiaron con una cámara réflex digital Nikon D3300. La concentración mínima inhibitoria se determinó realizando tres replicas biológicas.

7.3 Aislamiento de las bacterias de *A. oligospora*

Para aislar solo las bacterias, los cultivos fúngicos se inocularon en tubos de 50 ml con 25 ml de medio de cultivo LB suplementado con 5 µg/ml de benomilo y se incubaron a 28°C durante 3 días. De los cultivos, se estriaron las bacterias en agar LB suplementado de igual forma con 5 µg/ml de benomilo, se analizó la morfología colonial y se aislaron dos colonias para generar cultivos puros.

7.4 Tinción Gram

Para identificar las bacterias asociadas a *A. oligospora*, la primera aproximación fue realizar una tinción de Gram que facilita conocer la morfología bacteriana y diferenciarlas a nivel de la estructura y composición bioquímica de la

pared celular. Esta al ser un tipo de tinción diferencial, permite discernir entre las bacterias Gram positivas que se tiñen de morado y las Gram negativas que se tiñen de rosado.

Se realizó un estriado a partir de los cultivos bacterianos puros en sobre agar Luria Bertani y se colocaron en incubación a 37°C durante 24 horas hasta obtener colonias asiladas. Posteriormente, se realizó un frotis de cada aislado sobre un portaobjetos y se fijó con calor. Una vez fijado se agregó cristal violeta por 1 minuto y se lavó con agua destilada, se agregó Yodo-Lugol por 1 minuto y de igual manera se enjuagó con agua destilada. Posteriormente se adicionó alcohol- acetona por 5 segundos y se enjuagó con agua destilada; finalmente se agregó safranina, se dejó actuar por 1 minuto y se enjuagó por última vez (Rodríguez, et al., 2018).

7.5 Extracción de ADN

7.5.1 Extracción de ADN a partir de bacterias aisladas

Una vez, generados los cultivos axénicos, se inocularon en medio LB líquido y se incubaron a 28°C con una agitación de 150 rpm durante tres días. Siguiendo la metodología de Vazquez-Angulo y colaboradores (2012). Se tomó una alícuota de 1ml de cada cultivo, se colocó en un tubo de plástico de 1.5 ml estéril y se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 minutos para obtener una pastilla celular. Una vez obtenida la pastilla celular se decantó el exceso y posteriormente se agregaron 600 µl de una solución de buffer de urea, se mezcló en vórtex por 2 minutos y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó por 1 minuto y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo de plástico estéril al que se le adicionaron 600 µl de una mezcla de fenol (50%) - cloroformo (48%)-alcohol isoamílico (2%). Después el tubo se centrifugó por 2 minutos para posteriormente recuperar el sobrenadante, al que se le agregó un volumen de isopropanol. Después de agitar suavemente el tubo, éste se centrifugó por 5 minutos hasta formar una pastilla de ácidos nucleicos. La pastilla de ADN se lavó con etanol frío al 70% y se dejó secar por 15 minutos. La pastilla se resuspendió en 50 µl de HPLC estéril se agregó 1 µl de RNAsa a cada tubo y se incubó a 37°C durante 30 minutos, finalmente se almacenó a -20°C hasta su posterior uso.

Para determinar la calidad del ADN, las muestras se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa 1% con bromuro de etidio, así mismo se determinó la concentración de ácidos nucleicos en un espectrofotómetro (Nanodrop™)

2000/2000c, ThermoFisher Scientific). Las muestras de ADN posteriormente se diluyeron a una concentración de 100 ng/μl, y se utilizaron para las reacciones de PCR. Las reacciones de PCR se realizaron conforme las indicaciones de la enzima DreamTaq DNA polimerase Thermo Scientific® para la amplificación de la región 16S rRNA.

7.5.2 Extracción de ADN a partir de micelio

Los cultivos fúngicos se inocularon sobre un disco de papel celofán de 9 cm en cajas Petri con medio de cultivo PDA con un disco de 5 mm de diámetro de micelio de cada una de las cepas de *Arthrobotrys oligospora*, los cultivos se incubaron a 28°C durante 6 días, hasta obtener una formación de micelio de aproximadamente 6 - 7 cm de diámetro. Una vez transcurridos los 6 días, se procedió con la metodología de Vazquez-Angulo y colaboradores (2012) en donde el micelio se colectó, se envolvió en aluminio y se depositó en un recipiente con nitrógeno líquido(N_{2(l)}) hasta su uso posterior. Una vez que el micelio se encontraba congelado se colocó en un mortero con N_{2(l)} y se molió con ayuda del pistilo hasta obtener un polvo fino de tonalidad blanca/ rosa tenue el cual se colocó en un tubo de 1.5 ml previamente enfriado con N_{2(l)}. A cada tubo se agregaron 600 μl de una solución de buffer de urea, se mezcló en vórtex por 2 minutos y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó por 1 minuto y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo de plástico estéril al que se le adicionaron 600 μl de una mezcla de fenol (50%) - cloroformo (48%)-alcohol isoamílico (2%). Después el tubo se centrifugó por 2 minutos para posteriormente recuperar el sobrenadante, al que se le agregó un volumen de isopropanol. Después de agitar suavemente el tubo, éste se centrifugó por 5 minutos hasta formar una pastilla de ácidos nucleicos. La pastilla de ADN se lavó con etanol frío al 70% y se dejó secar por 15 minutos. La pastilla se resuspendió en 50 μl de HPLC estéril, se agregó 1 μl de RNasa a cada tubo y se incubó a 37°C durante 30 minutos.

Para determinar la calidad del ADN, las muestras se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa 1% con bromuro de etidio, así mismo se determinó la concentración de ácidos nucleicos en un espectrofotómetro (Nanodrop™ 2000/2000c, ThermoFisher Scientific). Las muestras de ADN se diluyeron a una concentración de 100 ng/μl para posteriormente usarlas en reacciones de PCR en amplificación del gen ribosomal 16S para detectar bacterias y de la región del ARN ribosomal ITS1-5.8S-ITS2 para hongos. Las reacciones de PCR se realizaron

conforme las indicaciones de la enzima DreamTaq DNA polimerase Thermo Scientific® para la amplificación de la región ITS1-5.8S-ITS2.

7.6 Amplificación del gen 16S rRNA

La secuencia del gen ribosomal 16S se amplificó usando los cebadores universales para bacterias de la empresa T4 Oligo 8F (AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG) y 1492R (CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT) a partir de 100 ng de ADN genómico de las siete cepas. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de 50 µl bajo las condiciones en el termociclador (Termociclador Bio Rad T100): desnaturalización inicial a 95°C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos, desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, alineamiento a 56°C por 40 segundos, polimerización a 72°C por 1:50 minutos. Finalmente, las reacciones se finalizaron después de una extensión a 72°C por 8 minutos. Los amplicones se analizaron en un gel de agarosa al 1.0% con un porcentaje de 0.4% de 2bromuro de etidio mediante electroforesis y visualizando las bandas de ADN en un transiluminador de UV.

7.7 Amplificación del marcador los ITSs de *A. oligospora*

La secuencia de la región ITS1-5.8S-ITS2 se amplificó usando los cebadores de la empresa T4 Oligo ITS1 (TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) e ITS4 (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) a partir de 100 ng de ADN genómico de cada una de las siete cepas de *A. oligospora*. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de 50 µl bajo las condiciones en el termociclador (Termociclador Bio Rad T100): desnaturalización inicial a 95°C durante 3 minutos seguido de 40 ciclos, desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, alineamiento a 58°C por 30 segundos, polimerización a 72°C por 45 segundos y una extensión a 72°C por 5 minutos. Los amplicones se analizaron en un gel de agarosa al 1.0% con bromuro de etidio mediante electroforesis y visualizando las bandas de ADN con bromuro de etidio en un transiluminador de UV.

7.8 Purificación de reacciones de PCR

Se realizó la purificación de las siete reacciones de PCR mediante el kit comercial QIAquick® PCR Purification Kit de QIAGEN.

Se transfirió la reacción de PCR a un tubo nuevo y estéril de 1.5 ml y se agregaron cinco volúmenes de buffer de unión (PB) a nuestra reacción de PCR, en este caso al tener reacciones de la 50 µl, se agregaron 250 µl de buffer PB.

Posteriormente se colocó la columna de resina en un tubo colector de 2ml y se transfirió la mezcla a la columna previamente lavada.

Se centrifugó la columna a 13,000 rpm durante 1 minuto hasta que la mezcla pasó a través de la columna y se desechó el sobrenadante del tubo colector.

Se adicionaron 750 µl de buffer de lavado (PE) a la columna y se centrifugó por 1 minuto a 13,000 rpm para posteriormente desechar el sobrenadante del tubo colector. Se centrifugó una vez más a 13,000 rpm para descartar cualquier residuo de buffer PB, se desechó el sobrenadante y se transfirió la columna a un tubo nuevo y estéril de 1.5 ml.

Para obtener el ADN se adicionaron 30 µl de agua HPLC directamente en el centro de la membrana de la columna y se centrifugó durante 1 minuto a 13,000 rpm. Las muestras se almacenaron a -20°C y posteriormente se enviaron a la Unidad de Servicios Genómicos LANGE BIO-CINVESTAV, Campus Guanajuato para ser secuenciadas con ambos oligonucleótidos (8F y 1492R) mediante el método Sanger.

7.9 Análisis filogenéticos

Se obtuvieron dos secuencias por muestra una del cebador forward (8F) y una del cebador reverse (1492R), estas fueron editadas con el programa Chromas 2.6.6, en el cual se eliminaron los extremos de mala calidad para posteriormente exportarlas en formato Fasta. Una vez editadas las secuencias se ensamblaron con ayuda del programa CAP3 para obtener una sola secuencia por muestra. En la primera aproximación se realizó un BLAST por secuencia en el National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Tabla 2) para comparar nuestras secuencias problema con la base de datos de GenBank e identificar el género de las bacterias con mayor grado de homología para posteriormente realizar una búsqueda de secuencias de referencia previamente usadas en estudios de taxonomía filogenética.

Las secuencias de los ARNs ribosomales bacterianos se alinearon con secuencias de referencia en una matriz (1411 caracteres), utilizando el software MacClade 4.08a. Posteriormente esta se usó para realizar filogenias usando el software MrBayes 3.2.7a para generar un árbol basado en la inferencia bayesiana y el software RAxML 7.2.6 para generar un árbol de máxima verosimilitud a partir de 1000 réplicas usando el modelo GTRGAMMA. Para ambos arboles únicamente se

colocaron los valores mayores a 0.90 en inferencia bayesiana y 50 en máxima verosimilitud.

7.10 Prueba de susceptibilidad a antibióticos

Para estandarizar las suspensiones de los microorganismos a 1.5×10^8 CFU/ml se prepararon los estándares de McFarland con ácido sulfúrico (1%) y cloruro de bario (1.175%). Los cultivos axénicos de las bacterias aisladas de las cepas A6, A12, A13, R2-1, R2-6, R2-13 y R2-14 se inocularon en medio LB líquido y se incubaron a 37 °C durante 24 horas a 150 rpm hasta obtener una turbidez igual al tubo 0.5 de la escala de McFarland. Se prepararon placas Agar Mueller-Hinton (MHA) y discos de papel filtro Whatman No. 1 con un diámetro de 5 mm. Los discos de papel se colocaron sobre el medio de cultivo y se les agregó 10 µl, conteniendo 0, 1.25, 2.50, 3.75, 5 y 6.25 µg de los siguientes antibióticos: kanamicina, ampicilina, tetraciclina, estreptomicina y 0, 0.25, 0.50, 1, 1.5 y 2 µg de cloranfenicol.

Las cajas de MHA se dejaron abiertas en la campana a temperatura ambiente para minimizar cualquier exceso de humedad, una vez obtenida la turbidez deseada de nuestros cultivos se agitó la suspensión para homogenizar y se sumergió un hisopo estéril, removiendo el exceso de líquido del hisopo presionándolo contra la pared del tubo. Se inocularon las cajas de MHA empezando por la parte de arriba, cubriendo toda la placa frotando de ida y vuelta de un borde al otro y rotando la placa aproximadamente 60°, para garantizar que el inóculo fuera distribuido de manera homogénea, posteriormente se incubaron las placas durante 15 minutos a 37 °C, una vez transcurrido el tiempo, se colocaron los discos con los antimicrobianos con ayuda de una pinza, haciendo ligera presión sobre ellos para evitar que estos se cayeran y asegurando un contacto completo con la superficie del agar. Las placas se incubaron a 37 °C y se revisaron después de 24 horas.

7.11 Pruebas bioquímicas API®

Se utilizaron pruebas bioquímicas API® 20E de Biomerieux. Los cultivos axénicos de las siete bacterias se pusieron a crecer en agar LB durante 24 horas a 37°C, una vez obtenidas las colonias deseadas, se procedió a preparar el inóculo para las pruebas. Se tomaron de 2 a 3 colonias con ayuda de un asa bacteriológica y se depositaron en 5 ml de NaCl 0.85% estéril y se mezclaron en vórtex hasta obtener una solución homogénea, esto se hizo con las siete cepas bacterianas. Se adicionaron 5 ml de agua destilada estéril en la base de la prueba para crear una

atmosfera de humedad, posteriormente se inoculó la suspensión bacteriana de manera lenta con ayuda de una micropipeta para evitar la formación de burbujas, las pruebas CIT, VP y GEL fueron llenadas por completo, tanto el tubo como la cúpula, para las pruebas ADH, LDC, ODC, H₂S y URE se creó una atmosfera anaerobia colocando el tubo lleno con el inóculo y la cúpula con aceite vegetal estéril, finalmente para el resto de las pruebas (ONPG, TDA, IND, GLU, MAN, INO, SOR, RHA, SAC, MEL, AMY, ARA) únicamente se llenó el tubo. Se incubaron las pruebas a 37 °C durante 24 horas. Una vez transcurrido ese tiempo se adicionaron de 3 a 5 gotas de solución TDA al microtubo de la prueba TDA, se adicionaron de 3 a 5 gotas de reactivo Kovacs al microtubo de la prueba IND y se adicionaron 1 gota de reactivo VP1 y 1 gota de reactivo VP2 al microtubo de la prueba VP y se dejaron incubar 5 minutos a temperatura ambiente.

Las pruebas nos permiten determinar lo siguiente: β -galactosidasa (ONPG): presencia o ausencia de la presencia de la enzima β galactosidasa mediante el compuesto orgánico O-nitrofenil- β -D-galactopiranosido(ONPG). Arginina-dihidrolasa (ADH): presencia o ausencia de producción de la enzima dihidrolasa que convierte la arginina en citrulina y posteriormente en ornitina. Lisina Descarboxilasa (LDC): presencia o ausencia de la enzima lisina descarboxilasa, mediante la descarboxilación de la lisina. Ornitina Descarboxilasa (ODC): presencia o ausencia de la enzima ornitina descarboxilasa (ODC), que produce putrescina a partir de la ornitina. Utilización del Citrato (CIT): utilizar citrato como única fuente de carbono y compuestos amoniacales como única fuente de nitrógeno en su metabolismo, provocando una alcalinización del medio. Producción de H₂S (H₂S): capacidad de producir o no sulfuro de hidrogeno. Ureasa (URE): capacidad de desdoblar la urea formando dos moléculas de amoníaco por acción del enzima ureasa. Triptofano Desaminasa (TDA): presencia o ausencia de la enzima triptófano desaminasa tras la adición de cloruro férrico. Producción de Índol (IND): presencia de la enzima triptofanasa tras la producción de indol. Producción de acetoína (VP): capacidad de fermentar la glucosa por la vía butanodiólica, formando acetoína. Gelatinasa (GEL): presencia o ausencia de las enzimas gelatinasas para hidrolizar gelatina a péptidos y aminoácidos. Fermentación-oxidación de glucosa (GLU): capacidad de fermentar la glucosa. Fermentación-oxidación de manitol (MAN): capacidad de fermentar el manitol liberando productos ácidos. Fermentación-oxidación de Inositol (INO): capacidad de fermentar inositol. Fermentación-oxidación de sorbitol (SOR): capacidad

de fermentar sorbitol. Fermentación-oxidación de ramnosa (RHA): capacidad de fermentar ramnosa. Fermentación-oxidación de sacarosa (SAC): capacidad de fermentar sacarosa. Fermentación-oxidación de melibiosa (MEL) capacidad de fermentar melibiosa. Fermentación-oxidación de amigdalina (AMY): capacidad de fermentar amigdalina. Fermentación-oxidación de arabinosa (ARA) capacidad de fermentar arabinosa.

7.12 Remoción de las bacterias asociadas a *A. oligospora*

Con base en los resultados previos de los antibiogramas se prepararon placas de PDA suplementado con los seis antibióticos: kanamicina, ampicilina, tetraciclina, estreptomicina, cloranfenicol, rifampicina en concentraciones de 10, 10, 10, 10, 6 y 3 µg/ml respectivamente.

Con base en la literatura Wang, y colaboradores (2017), se tomó micelio *A. oligospora* y se inoculó cerca del borde de la caja de PDA adicionada con los seis antibióticos, se incubó durante 4 días a 28°C. Una vez transcurridos los 4 días con un bisturí se cortó micelio, principalmente las puntas de las hifas del frente de crecimiento y se colocó en una caja nueva de PDA con los seis antibióticos. Después de haber realizado este procedimiento seis veces, se tomó un disco de micelio de 5 mm de la periferia y se inoculó en el centro de una placa de PDA sin antibiótico y se incubó durante 5 días a 28°C hasta la obtención de conidios. La validación de ausencia de bacterias se realizó de manera molecular mediante PCR usando los oligonucleótidos específicos para el gen ribosomal 16S.

7.13 Antagonismo

Se prepararon cajas Petri con medio de cultivo PDA, cubiertas con papel celofán y posteriormente se inocularon con un disco de 5 mm de diámetro de micelio de cada una de las cepas de *A. oligospora*, para realizar pruebas con seis fitopatógenos, los cultivos se incubaron a 28°C durante 4 días, hasta obtener una formación de micelio de aproximadamente 6 - 7 cm de diámetro. Una vez transcurridos los 4 días se retiraron los celofanes con micelio de las siete cepas de *A. oligospora* y se inoculó en el centro de la placa un disco de 5 mm de diámetro de micelio de los fitopatógenos a evaluar (*Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botrytis cinerea*, *Sclerotium rolfsii* y *Rhizoctonia solani*) por cepa de *A. oligospora* más el control sin tratamiento. Como control, los fitopatógenos se inocularon en placas de PDA sin tratamiento. Los cultivos se incubaron a 28°C hasta

que el control correspondiente alcanzara un diámetro de aproximadamente 7-8 cm de diámetro. Los cultivos se fotografiaron y los diámetros de las colonias se determinaron usando ImageJ versión 1.52a.

Para obtener el porcentaje de inhibición de cada cepa frente a los fitopatógenos se empleó la siguiente ecuación (Talavera-Ortiz, et al., 2020):

$$\% \text{ inhibición} = \frac{(V - Ve) * 100}{V}$$

Donde:

V= Diámetro del micelio control del fitopatógeno

Ve= Diámetro promedio del crecimiento del micelio experimental

De igual forma se determinó la desviación estándar para observar el grado de variabilidad que existía entre las mediciones de porcentajes de inhibición.

8 Resultados

8.1 Inhibición de crecimiento fúngico con benomilo en medio PDA

La primera aproximación para separar las bacterias de los hongos, fue inhibir el crecimiento del hongo usando un antifúngico. Para determinar la dosis mínima inhibitoria del agroquímico benomilo (Promyl®, PTI), sobre estas siete cepas, se trabajaron con cajas de PDA suplementadas con concentraciones de 0, 1, 2, 3 y 4 µg/ml de benomilo.

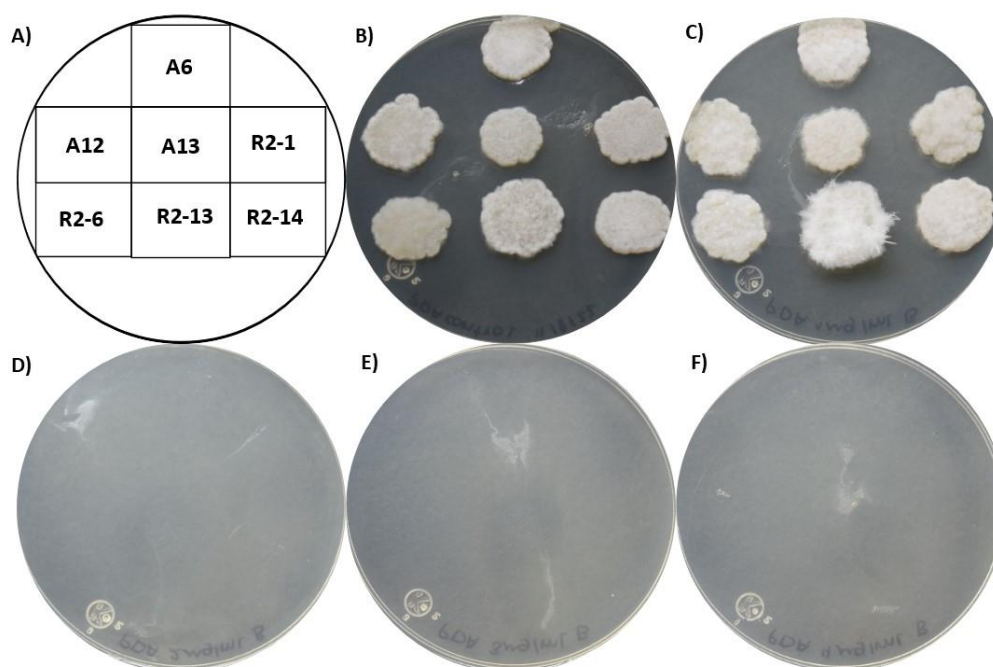


Figura 7. Inhibición de las siete cepas de *A. oligospora* con benomilo en medio PDA. Placas PDA suplementadas con benomilo de uso agrícola (Promyl®, PTI), se inocularon con gotas de 5 µl conteniendo 1500 conidios de las cepas indicadas en A), donde se muestra el posicionamiento de las siete cepas en los medios de cultivo. B) PDA control, con 0 µg/ml de benomilo C) PDA con 1 µg/ml de benomilo D) PDA con 2 µg/ml de benomilo E) PDA con 3 µg/ml de benomilo F) PDA con 4 µg/ml de benomilo.

Tras cinco días de incubación, se observó una inhibición completa en la caja suplementada con 2 µg/ml de benomilo al medio, este experimento se repitió por triplicado obteniendo una dosis mínima inhibitoria de 2 µg/ml para las siete cepas (Fig. 7). Notoriamente, las bacterias tampoco presentaron crecimiento cuando el hongo se inhibió con Benomilo, sugiriendo que dependen del hongo para su desarrollo o bien que el PDA no es un medio de cultivo apropiado para el desarrollo de estas bacterias.

8.2 Crecimiento bacteriano con benomilo en medio LB.

Con el objetivo de aislar las bacterias del hongo, también se determinó la dosis mínima inhibitoria del agroquímico benomilo, en medio Luria Bertani, un medio generalista para bacterias.

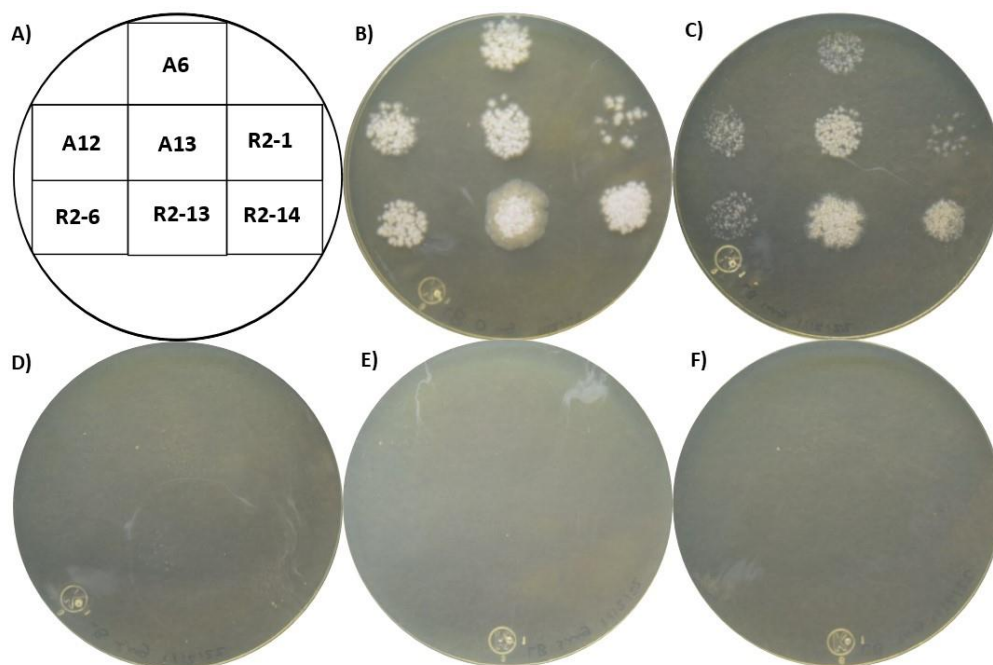


Figura 8. Inhibición de las siete cepas de *A. oligospora* con benomilo en medio Luria Bertani (LB). Placas de medio de cultivo LB suplementadas con benomilo de uso agrícola, se inocularon con 1500 conidios y se incubaron a 28°C por 5 días. A) Posicionamiento de las siete cepas en la caja. B) LB control, con 0 µg/ml de benomilo C) LB con 1 µg/ml de benomilo D) LB con 2 µg/ml de benomilo E) LB con 3 µg/ml de benomilo F) LB con 4 µg/ml de benomilo.

Se observó un crecimiento fúngico menor de las cepas en medio LB, incluso en el control, siendo la cepa R2-1 la que presentó un menor crecimiento desde el control. En la placa con 1 µg/ml de benomilo se observó poco crecimiento por parte de las siete cepas, sin embargo, se vuelve a presentar una completa inhibición de las cepas al haber adicionado 2 µg/ml de benomilo al medio (Fig. 8). Considerando que las cepas fúngicas contienen bacterias al analizarlas al microscopio, se empleó benomilo (metil 1-(butilcarbamoil)-2-bencimidazol carbarnato), un imidazol de amplio espectro que interactúa con la β -tubulina, inhibiendo su polimerización y formación de microtúbulos, de manera que se esperaba que al añadirlo únicamente se viera afectado el desarrollo del nematófago. Sin embargo, como se puede observar en las

figuras 8 y 7, el crecimiento bacteriano parece ser dependiente del desarrollo de *A. oligospora*.

8.3 Separación de las bacterias de *A. oligospora*

Dado que en medio sólido no fue posible separar las bacterias del hongo y considerando el crecimiento tan mínimo por parte de *A. oligospora* en LB, las cepas fúngicas se inocularon en medio LB líquido suplementado con 5 µg/ml del fungicida benomilo y se incubaron a 28°C durante 3 días. Posteriormente, a partir de los cultivos se estriaron las bacterias en agar LB suplementado con benomilo, este proceso se repitió dos veces para asegurarnos de obtener únicamente bacterias. Se analizó la morfología colonial y se realizaron cultivos axénicos y posteriormente se realizó una tinción de Gram para lograr diferenciar las bacterias con base en la composición de su pared celular y su morfología.

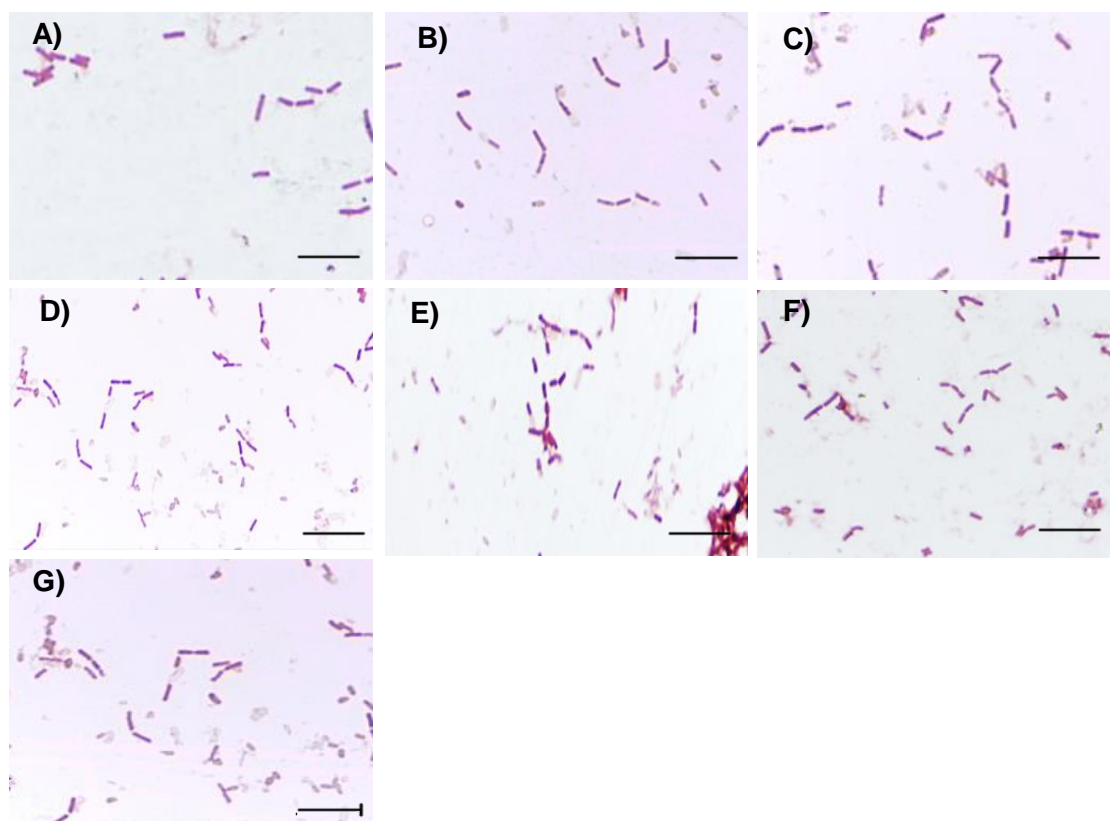


Figura 9. Análisis de la bioquímica de la pared celular y morfología de las bacterias asociadas a *A. oligospora*. Se realizaron tinciones Gram a las bacterias asociadas a las cepas de *A. oligospora*: **A)** A6, **B)** A12, **C)** A13, **D)** R2-1, **E)** R2-6, **F)** R2-13 y **G)** R2-14. Las imágenes se tomaron usando un microscopio Leica ICC50 HDa un objetivo de 100x. Escala de barra 0.2 µm.

Al momento de realizar los aislados todas las cepas mostraban una morfología colonial similar, colonias de tonalidad crema, mucoides, con bordes irregulares y convexas, de manera que la tinción de Gram permitió determinar que las siete cepas (A6, A12, A13, R2-1, R2-6, R2-13 y R2-14) son bacilos Gram negativo (Fig. 9). También se observó solo un tipo de morfología bacteriana en cada cultivo y que es muy parecida entre los diferentes aislados, indicando que tenemos cultivos puros de cada aislado bacteriano.

8.4 Pruebas bioquímicas API®

Las pruebas bioquímicas API® 20E, son un sistema estandarizado, el cual permite una identificación rápida de bacterias pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae y otros bacilos gram negativos, mediante 20 test bioquímicos y una base de datos (bioMérieux SA VIII, 2010).

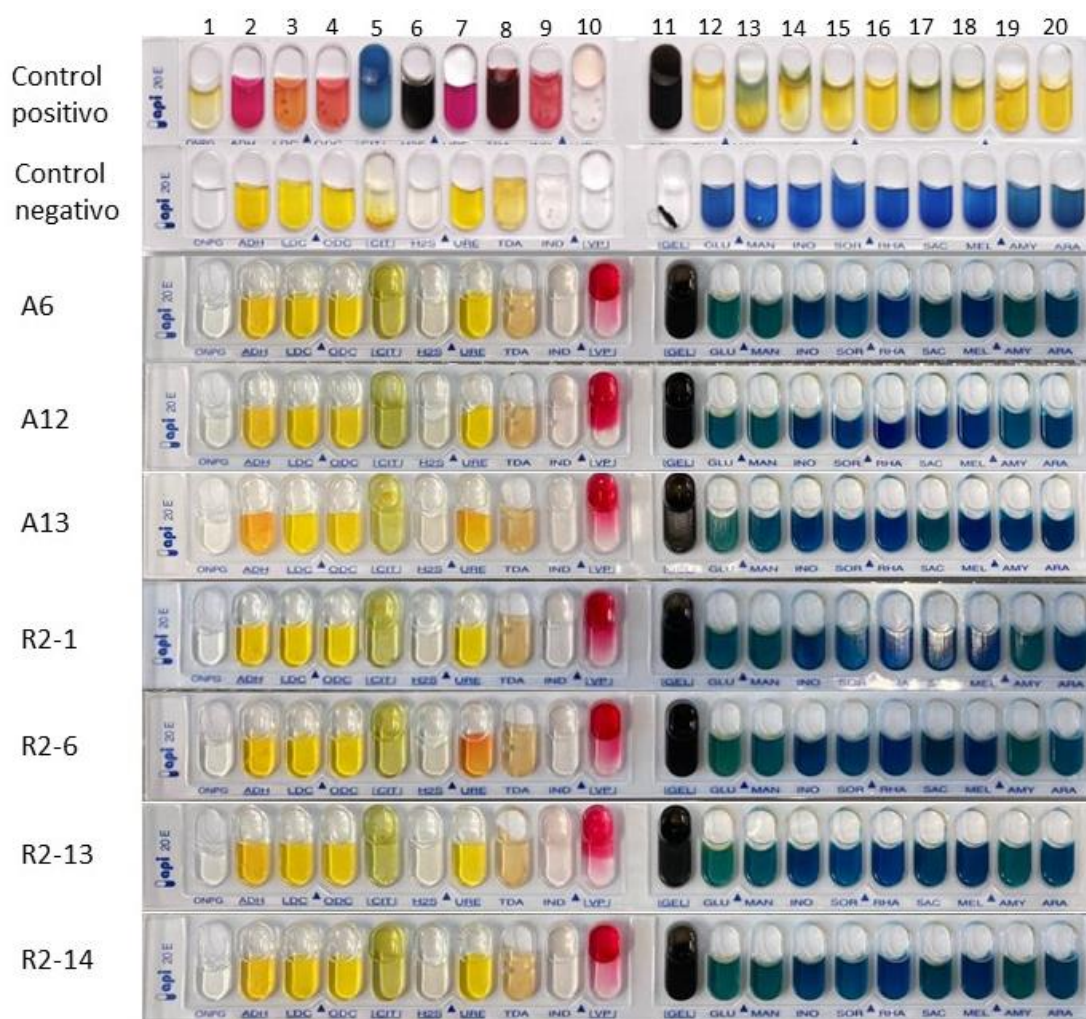


Figura 10. Pruebas bioquímicas API®. 1)ONPG 2)ADH 3)LDC 4)ODC 5)CIT 6)H2S 7)URE 8)TDA 9)IND 10)VP 11)GEL 12)GLU 13)MAN 14)INO 15)SOR 16)RHA 17)SAC 18)MEL 19)AMY 20)ARA

En este caso, como se observa en la figura 10, las siete cepas dieron negativo para las pruebas ONPG, ADH, LDC, ODC, CIT, H₂S, URE, TDA, IND. Las siete cepas son VP y GEL positivo de manera que todas fermentan la glucosa por la vía butanodiólica, formando acetoina y todas poseen enzimas gelatinasas que les permite hidrolizar gelatina a péptidos y aminoácidos.

Con estas pruebas se buscaba una identificación bioquímica, sin embargo, dado que la base de datos de Biomerieux cuenta con organismos de interés clínico, no se logró una identificación completa, puesto que se sugerían pruebas bioquímicas complementarias para una identificación certera, tomando esto en cuenta se optó por recurrir a la secuenciación de Sanger para poder determinar el género de las bacterias aisladas. Sin embargo, estas pruebas nos permitieron caracterizar de manera bioquímica las cepas aisladas, encontrando la presencia de gelatinasas y la ausencia de enzimas como la ornitina descarboxilasa, triptófano desaminasa, así como la incapacidad de utilizar citrato como única fuente de carbono y fermentar compuestos como el inositol, sorbitol, ramnosa, sacarosa, melibiosa, amigdalina y arabinosa por parte de las siete cepas.

8.5 Amplificación del gen ribosomal 16S

Una vez aisladas las bacterias y caracterizadas mediante pruebas bioquímicas y tinción de gram, se procedió a hacer una identificación molecular, por lo que se realizó extracción de ADN siguiendo el protocolo de Vázquez-Angulo y colaboradores., (2012).

La calidad del ADN se analizó mediante una electroforesis en un gel de agarosa 1% con bromuro de etidio y posteriormente se visualizó en un transiluminador de UV. Se observaron bandas de alto peso molecular, superior a las bandas de la escalera de 1Kb, demostrando que el ADN presenta buena integridad, que existe una cantidad adecuada y se encuentra poco degradada (Fig. 11) para poder realizar la amplificación del marcador molecular.

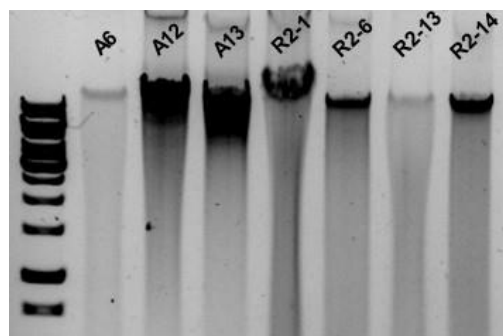


Figura 11. ADN genómico de las bacterias asociadas a *A. oligospora*. La calidad e integridad del ADN se analizó separando las muestras de ADN por electroforesis en un gel de agarosa 1% con bromuro de etidio. Para la estimación de tamaños moleculares se utilizó el marcador de peso molecular de 1Kb.

Para tener una aproximación más precisa sobre la identidad de las bacterias se procedió a amplificar el gen 16S rRNA, esta región de aproximadamente 1500 nucleótidos permite una identificación a nivel de genero e incluso especie en algunas bacterias, dado que es una región altamente conservada. Tomando esto en cuenta, se optó por amplificar el gen ribosomal 16S usando cebadores universales para bacterias 8F y 1492R a partir de 100 ng de ADN genómico de las siete cepas.

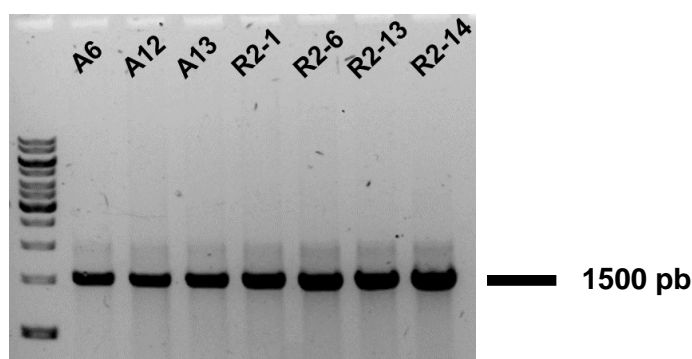


Figura 12. Amplificación del gen ribosomal 16S. Se realizó una reacción en cadena de la polimerasa, amplificando la secuencia completa del gen ribosomal 16S. Para estimar los tamaños moleculares de los amplicones se utilizó una escalera de peso molecular de 1Kb.

Como se observa en la figura 12 se obtuvieron bandas únicas en cada aislado bacteriano de 1500 nucleótidos, tamaño que coincide con el del gen 16S rRNA.

8.6 Purificación de las reacciones de PCR

Para eliminar cebadores, nucleótidos, enzimas y otras impurezas de las siete reacciones de PCR, se llevaron a cabo purificaciones mediante el QIAquick® PCR Purification Kit de QUIAGEN. Para determinar si la calidad de las purificaciones era adecuada se midió la concentración y pureza en un espectrofotómetro (Nanodrop™ 2000/2000c, ThermoFisher Scientific) aunado a esto para comprobar la calidad del ADN, se analizaron las muestras mediante electroforesis en un gel de agarosa 1% con bromuro de etidio (Figura 13).

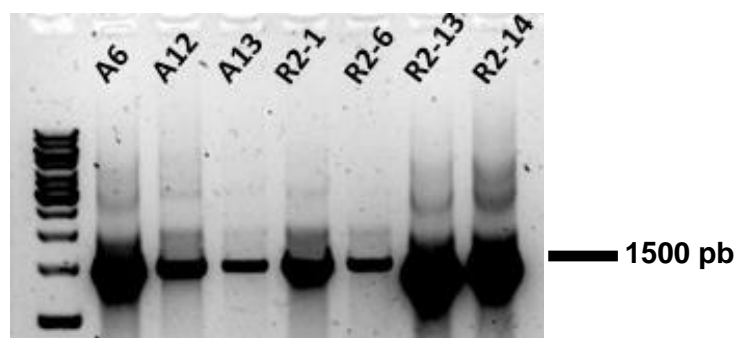


Figura 13. Purificación de la reacción de PCR a partir de ADN genómico de las bacterias aisladas. Electroforesis en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio de las purificaciones de las siete reacciones de PCR mediante el QIAquick® PCR Purification Kit de QUIAGEN.

Se observa la banda de 1500 pares de bases por parte de las siete cepas, lo cual coincide con el tamaño del gen ribosomal 16S. Así mismo las bandas de las cepas A6, R2-1, R2-13 y R2-14 presentan un mayor grosor dado a la alta concentración que presentaban, mayor a 100 ng/ µl.

8.5.- Análisis filogenético de las bacterias asociadas a *A. oligospora*

Una vez purificadas las muestras, se secuenció el marcador genético correspondiente a la región ribosomal 16S de las bacterias aisladas a partir de las cepas de *A. oligospora* (Anexos 1-7). Con las secuencias de nucleótidos se realizó una búsqueda por homología en la base de datos GenBank del NCBI, determinando a *Bacillus amyloliquefaciens* con mayor homología en este marcador genético (Tabla 2). Estos resultados sugieren que las siete cepas bacterianas son iguales o muy parecidas. Además, este análisis de homología de la secuencia nucleotídica es

consistente con las tinciones Gram, donde se observó solo la presencia de bacilos Gram negativos.

Tabla 2. Análisis BlastN para identificar homólogos en la base de datos del NCBI.

Después de editar y ensamblar las secuencias, se realizó un BLASTn en NCBI para obtener una aproximación del género bacteriano que corresponden las bacterias.

Cepa	Nombre científico	E value	Porcentaje de identidad	Accession number
A6	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0.00	99.93%	CP054415.1
A12	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0.00	99.93%	MT542326.1
A13	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0.00	100.00%	MT542326.1
R2-1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0.00	100.00%	CP054415.1
R2-6	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0.00	100.00%	CP054415.1
R2-13	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0.00	99.97%	MT542326.1
R2-14	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0.00	98.08%	CP054415.1

Tomando en cuenta el resultado arrojado por GenBank, se tomaron como referencia secuencias de diferentes especies del género *Bacillus* (Tabla 3), a partir de una filogenia realizada por Wang y colaboradores (2007) en donde de igual manera se usaba como marcador genético el gen ribosomal 16S.

Una vez determinadas las secuencias a usar (Tabla 3) se construyó una matriz para analizar la relación genética que existe entre las siete cepas aisladas con respecto a otras especies y cepas del género *Bacillus* usando dos aproximaciones: inferencia Bayesiana y máxima verosimilitud (Figura 13 y 14).

Como se observa en la figura 14, los valores de soporte basados en la inferencia bayesiana, hacen referencia a que existe muy poca variación genética específicamente entre las cepas A12 y R2-13 las cuales se encuentran agrupadas y entre las cepas A6, A13, R2-1, R2-6 y R2-14. Todas las cepas asociadas a *A. oligospora* se encuentran emparentadas con la especie *Bacillus amyloliquefaciens*, justo como se esperaba dado el BlastN realizado previamente.

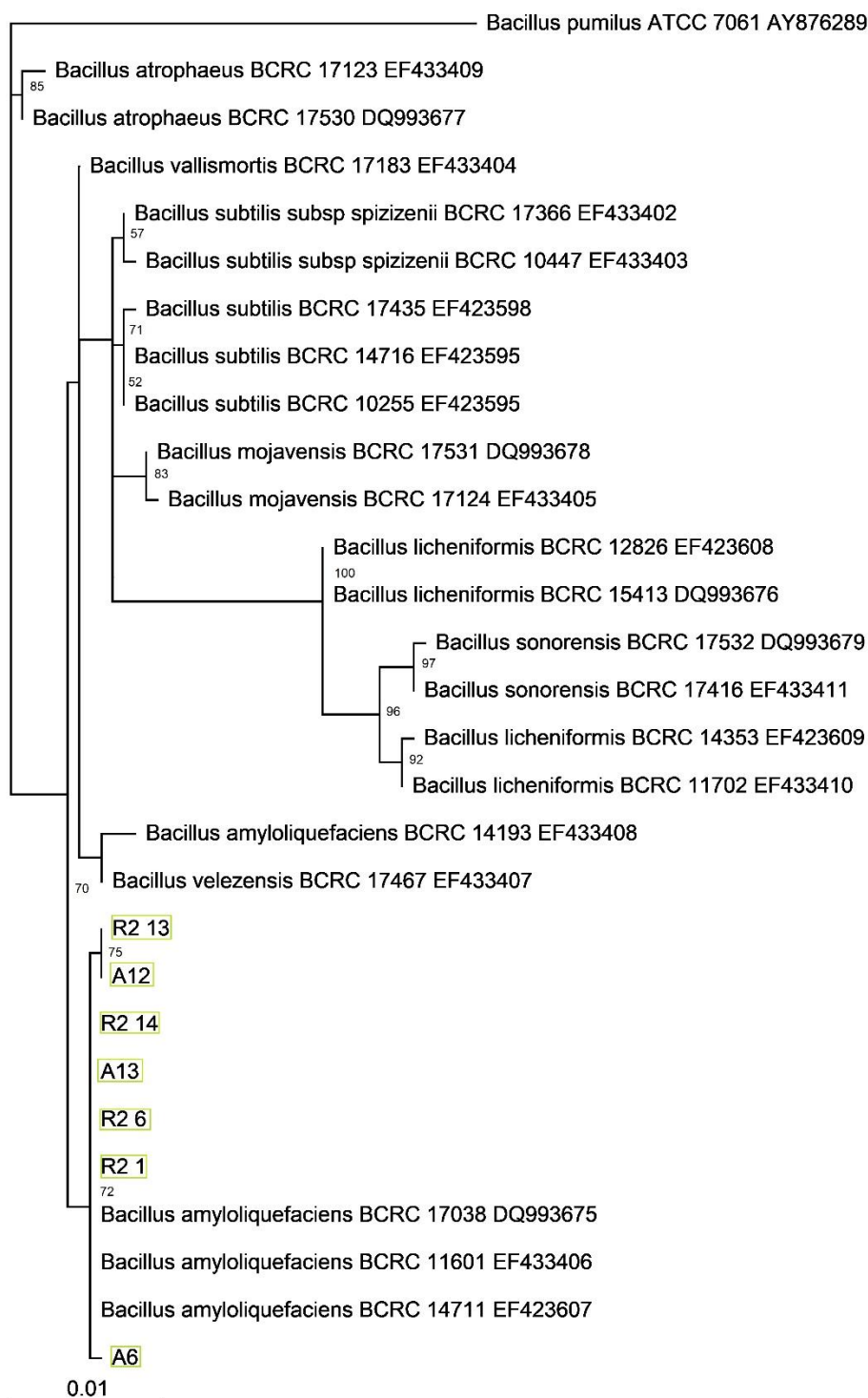


Figura 15. Árbol filogenético basado en máxima verosimilitud. Las cepas aisladas y secuenciadas de este proyecto están indicadas con un rectángulo verde. Se muestran las cepas de referencia con el nombre, así como la cepa y el número de acceso de la base de datos GenBank (Tabla 2). Los valores de soporte se indican en cada bifurcación con los valores obtenidos el método de máxima verosimilitud, así como la escala de divergencia.

Se puede observar que, usando la inferencia de máxima verosimilitud, al igual que con la inferencia bayesiana, las cepas R2-13 y A12 son genéticamente más similares en comparación con las otras cepas aisladas. Nuestros resultados muestran

que las cepas bacterianas asociadas a *A. oligospora* pertenecen a *Bacillus amyloliquefaciens*.

8.7 Susceptibilidad a diferentes antibióticos en las bacterias asociadas a *A. oligospora*

Con las bacterias aisladas se realizaron pruebas con diferentes tipos de antibióticos para determinar su susceptibilidad o bien si existía algún grado de resistencia por parte de alguno.

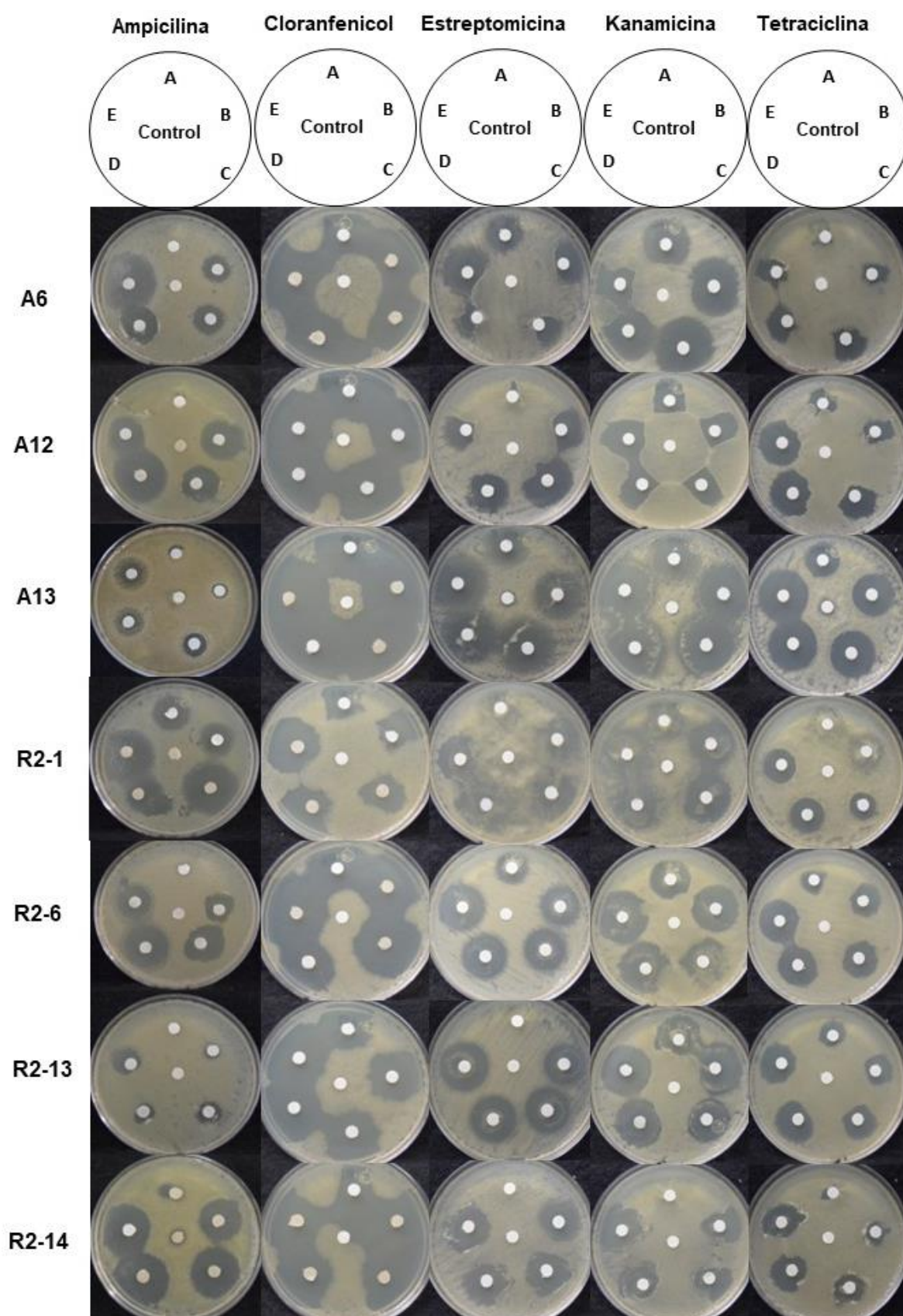


Figura 16. Pruebas de susceptibilidad a antibióticos. En las columnas se muestra el antibiótico empleado, las concentraciones fueron **A)** 0 **B)** 1.25 **C)** 2.5 **D)** 3.75 **E)** 5 y **F)** 6.25 µg para ampicilina, estreptomicina, kanamicina y tetraciclina y **A)** 0, **B)** 0.25, **C)** 0.50, **D)** 1, **E)** 1.5 y **F)** 2 µg para cloranfenicol. En las filas se indican las cepas de las bacterias aisladas: A6, A12, A13, R2-1, R2-6, R2-13 y R2-14.

El cloranfenicol es un antibiótico bacteriostático de amplio espectro, cuyo mecanismo de acción es mediante la interferencia en la síntesis de proteínas bacterianas (Vademecum, 2023). Este antibiótico se disuelve en etanol como solvente, se usaron dosis más bajas, en donde las cepas presentaron un ligero grado de inhibición con 0.5 µg/ml con excepción de la cepa R2-1, la cual presentó inhibición desde la dosis más baja 0.25 µg/ml.

La ampicilina es un antibiótico bactericida de amplio espectro, con efecto tanto en organismos Gram negativos como Gram positivos. En este caso, la inhibición fue muy fuerte en todas las cepas, con excepción de la R2-1, que esta se esparció uniendo los halos, de manera que únicamente se alcanza a ver crecimiento en el centro en donde se encuentra el control; en cuanto a la R2-1 se observa una inhibición gradual que va en aumento a partir de 1.25 µg/ml (Figura 16).

Los aminoglucósidos, al igual que la ampicilina son antibióticos de clase bactericida, es decir, inhiben la síntesis de proteínas de las bacterias. Tanto la estreptomicina como la kanamicina, son antibióticos pertenecientes al grupo de los aminoglucósidos, de manera que se esperaba el mismo efecto por parte de las siete cepas para estreptomicina y kanamicina, sin embargo, las cepas A6, A13 y R2-6, presentaron una inhibición a partir de 1.25 µg/ml tanto para estreptomicina como para kanamicina, mientras que la A12 presenta inhibición a partir de 1.25 µg/ml para kanamicina, pero 2.5 µg/ml para estreptomicina, R2-1 no presenta una completa inhibición para ninguna de las cinco concentraciones ya que dentro del halo formado hay formación de colonias, R2-13 susceptible a partir de 2.5 µg/ml para estreptomicina y 1.25 µg/ml para kanamicina, finalmente la R2-14 presentó inhibición hasta 2.5 µg/ml para los dos aminoglucósidos (Figura 16).

Finalmente, la tetraciclina al igual que el cloranfenicol, es un antibiótico de carácter bacteriostático que inhibe la síntesis de proteínas bacterianas, en este caso la inhibición fue mínima en 1.25 µg/ml para las siete cepas con excepción de la R2-1 en la cual se observa una inhibición ligera pero completa hasta 3.75 µg/ml.

En resumen, aunque las siete cepas fueron identificadas como *Bacillus amyloliquefaciens*, responden de manera diferente frente a los antibióticos, sin embargo, donde se presentó un mayor grado de inhibición fue en respuesta a la ampicilina.

8.8 Generación de cultivos de *A.oligospora* libres de bacterias

Una vez aisladas las bacterias asociadas al nematófago, se procedió a eliminar las bacterias de las cepas de *A.oligospora*, por lo que se emplearon cinco antibióticos en las concentraciones inhibitorias (Figura 16), realizando seis pases de micelio a cajas suplementadas con los antibióticos hasta asegurarnos que ya no existía crecimiento bacteriano. La ausencia de bacterias en los cultivos fúngicos, primero se observó al microscopio y se determinó mediante pruebas de PCR. Se extrajo el DNA de las siete cepas de *A. oligospora* sin bacterias “cepas curadas” y las cepas con bacterias, para realizar las reacciones de PCR, amplificando la región ribosomal 16S usando los cebadores 8F y 1492R. El gen ribosomal 16S de bacterias se amplificó solo en las cepas de *A. oligospora* con bacterias, obteniendo una banda de 1500 pb en todas las cepas (Figura 17A). Consistente con la observación al microscopio, el gen ribosomal no fue detectado en las cepas curadas, indicando efectivamente la ausencia de bacterias (Figura 17B).

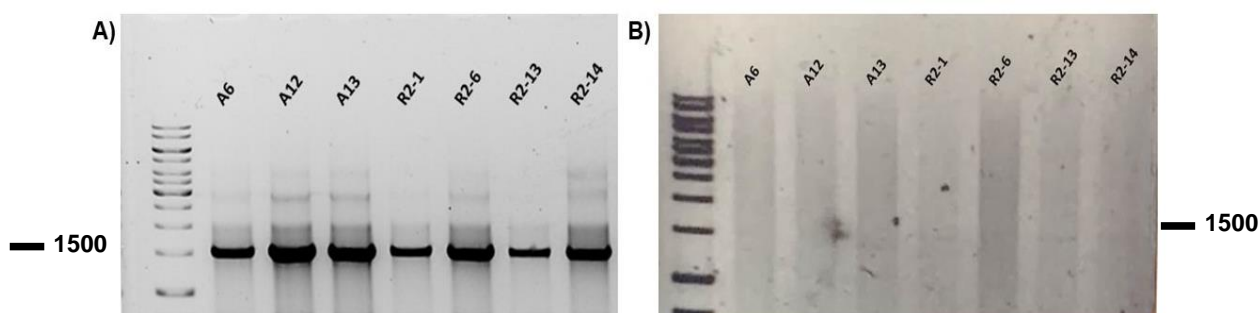


Figura 17. Amplificación de la región ribosomal 16s en cepas de *A.oligospora* pre y post limpieza. Amplificación de la región ribosomal 16s usando como templado ADN de **A)** cepas de *A. oligospora* asociadas con bacterias y **B)** “cepas curadas”, posterior a la limpieza realizada con seis antibióticos. Se usó el marcador de peso molecular 1 kb para la estimación de los tamaños moleculares.

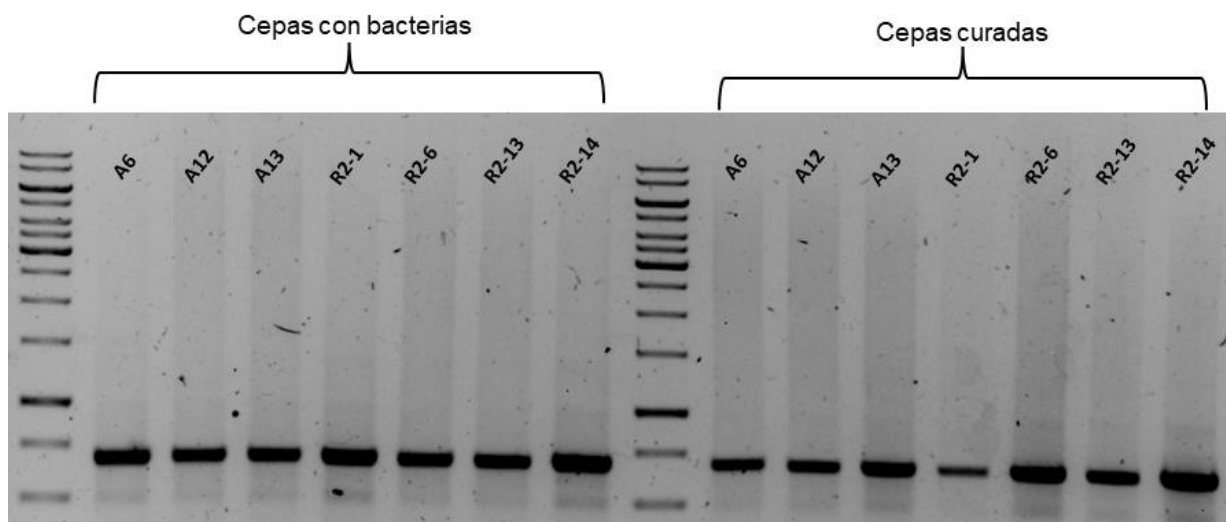


Figura 18. Amplificación de la región ITS1-5.8S-ITS2 de cepas de *A. oligospora*. Las reacciones de PCR se realizaron con los ADN templado usados en la figura 17. Se usó el marcador de peso molecular 1 kb para la estimación de los tamaños moleculares.

Una vez demostrado que la región ribosomal 16s había sido amplificada a partir de ADN extraído de micelio de las cepas de *A. oligospora* solo en los hongos con las bacterias asociadas (Figura 17), se realizó un PCR amplificando la región ITS1-5.8S-ITS2, obteniendo bandas de aproximadamente 600 pb por parte de las 7 cepas de *A. oligospora* asociadas con bacterias como también en las 7 cepas curadas (Figura 18) esto nos permite corroborar de igual forma que la ausencia de la banda de 1500 pb por parte de las cepas aisladas no se debe a la ausencia de ADN o a la calidad del material genético si no a la ausencia de bacterias asociadas a las cepas del nematófago.

8.9 Ensayo de antagonismo

Dentro del género de *Bacillus* podemos encontrar especies como: *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus amyloliquefaciens* que actúan como potenciales agentes de biocontrol frente a fitopatógenos de frutas y plantas dado su producción de elementos volátiles y la gran cantidad de enzimas líticas con las que cuentan (Ramírez, et al., 2022). En la actualidad, *B. amyloliquefaciens* es comercializada para el control biológico de varios hongos fitopatógenos (Chowdhury et al., 2015). Las 7 cepas de *A. oligospora* asociadas con bacterias fueron evaluadas en medio PDA contra seis fitopatógenos *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botrytis cinerea*, *Sclerotium rolfsii* y *Rhizoctonia solani*.

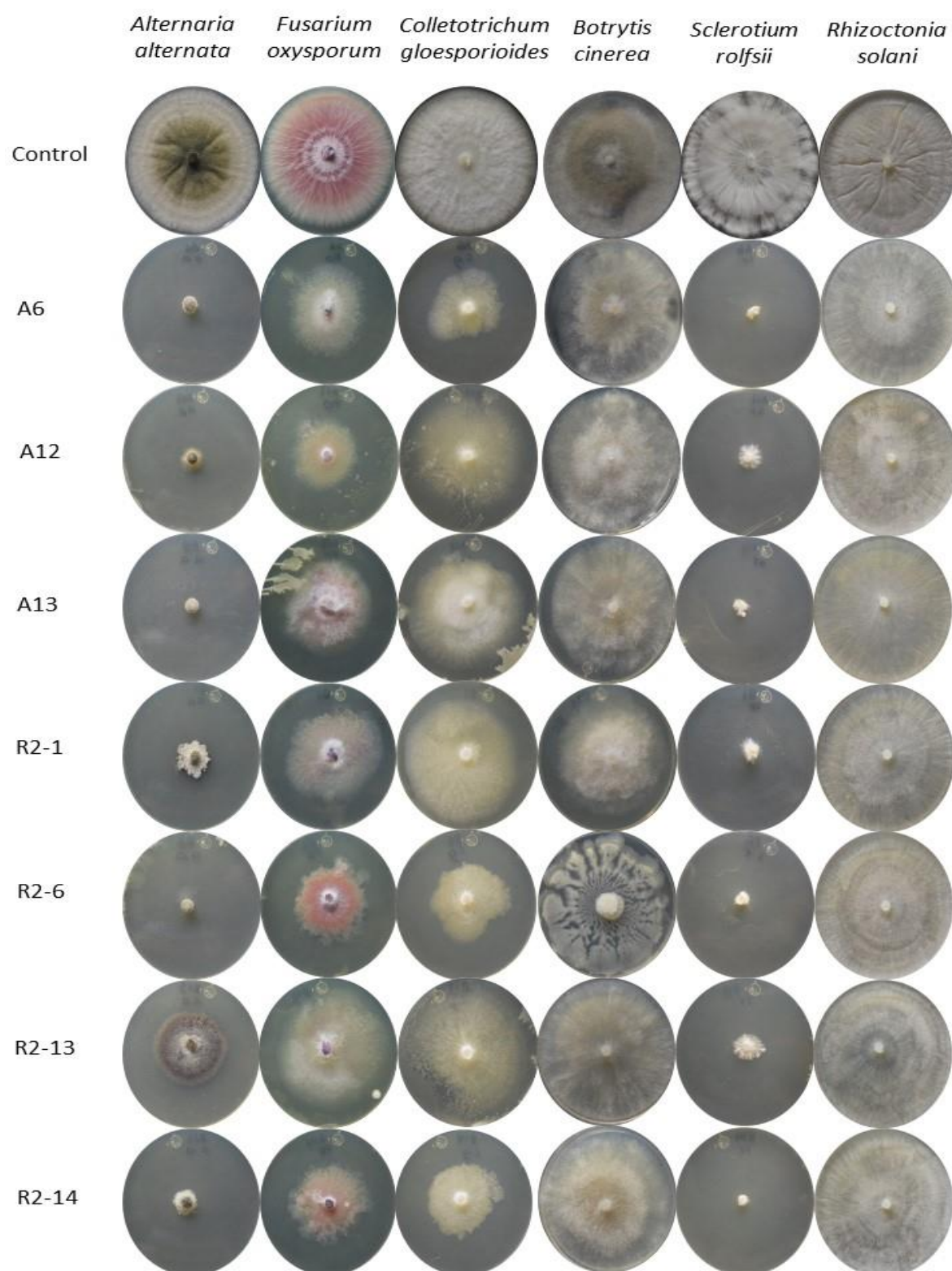
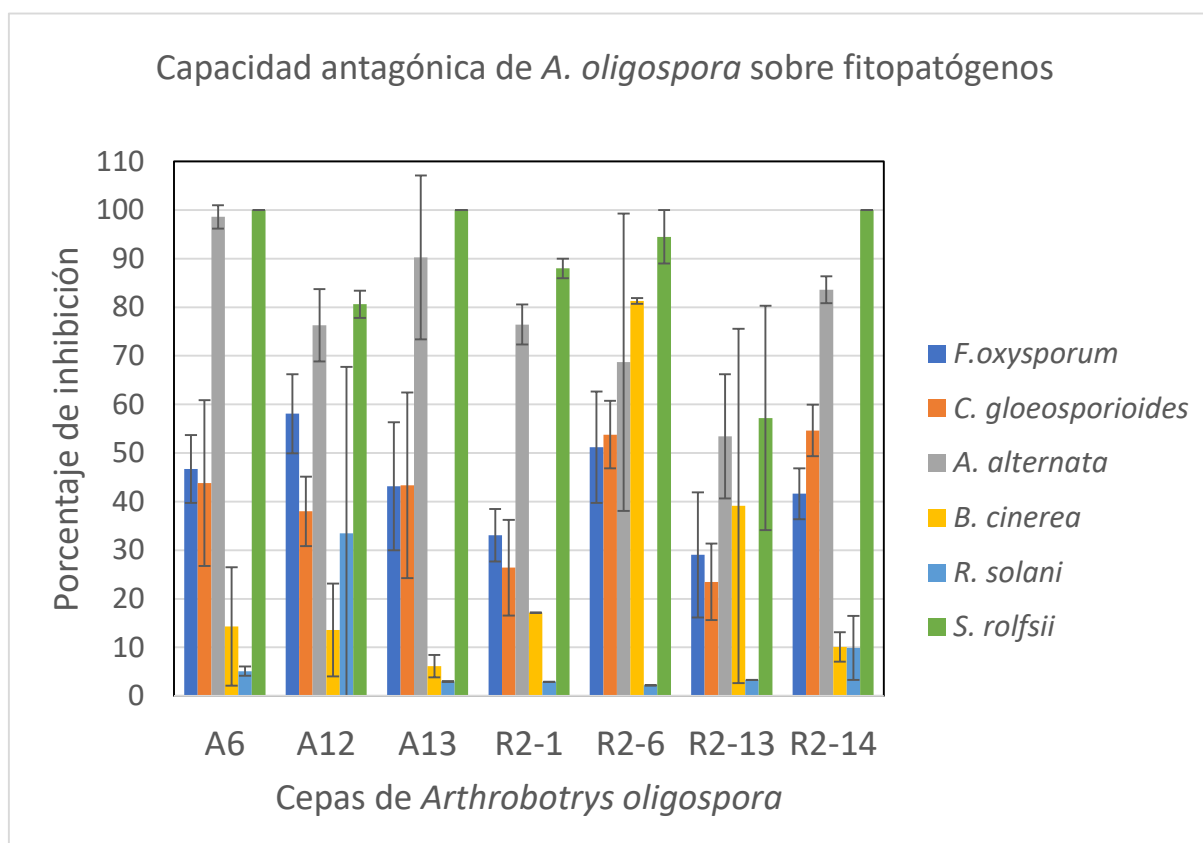


Figura 19. Capacidad antagónica de *A. oligospora* contra hongos fitopatógenos. Medios de cultivo PDA cubiertos con membranas de celofán se inocularon con discos de micelio (5 mm) de las cepas de *A. oligospora*. Se incubaron 4 días a 28°C, se retiró el celofán con micelio y se inocularon los hongos fitopatógenos indicados en la figura. Como control los fitopatógenos se cultivaron en placas de PDA sin tratamiento.



Grafica 1. Capacidad antagónica de *A. oligospora* sobre fitopatógenos. El ensayo de antagonismo se realizó por triplicado, para obtener un promedio de inhibición y la variación experimental expresada en la desviación estándar. Los cultivos se incubaron a 28°C durante 5 días. Barras de error indican la desviación estándar.

Al comparar las siete cepas nematófagas, se puede observar en la figura 19 que las cepas de *A. oligospora* presentan un fuerte antagonismo contra *A. alternata* y *S. rolfii*, una actividad antagónica moderada contra *F. oxysporum* y *C. gloeosporioides* y mínima actividad contra *B. cinerea* y *R. solani* (Figura 19 y 20). Las cepas A6, A13 y R2-14 fueron las mejores para antagonizar presentando el 100% de inhibición sobre *Sclerotium rolfii* ya que este no mostró crecimiento alguno después de haber sido incubado a 28°C durante 5 días. También las cepas de *A. oligospora* presentaron un porcentaje de inhibición mayor al 50% por parte de las siete cepas frente a *Alternaria alternata*. Sin embargo, el efecto antagónico no fue generalizado y un porcentaje de inhibición sobre fue mínimo. Estos resultados indican que las cepas nematófagas también tienen gran potencial para el control de hongos fitopatógenos en los sistemas de producción agrícola.

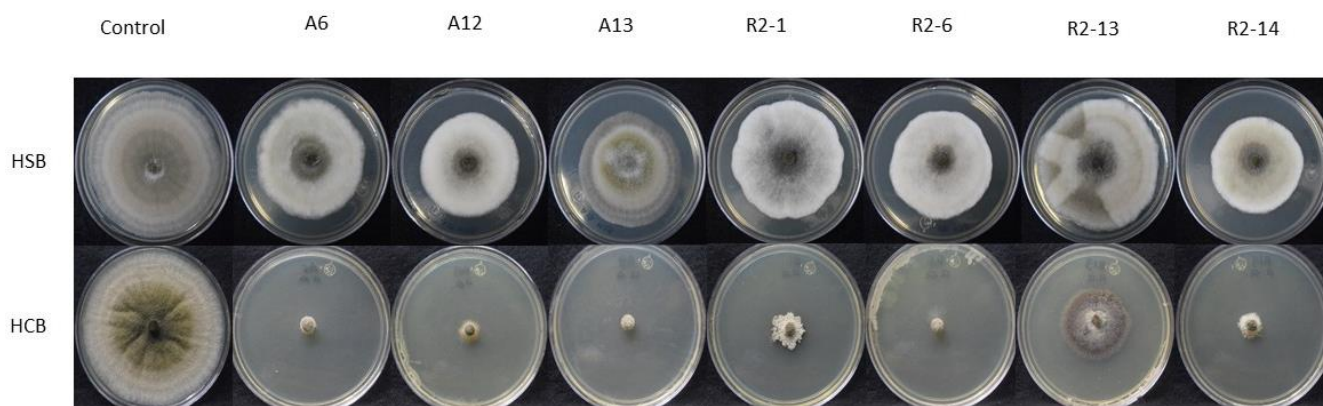
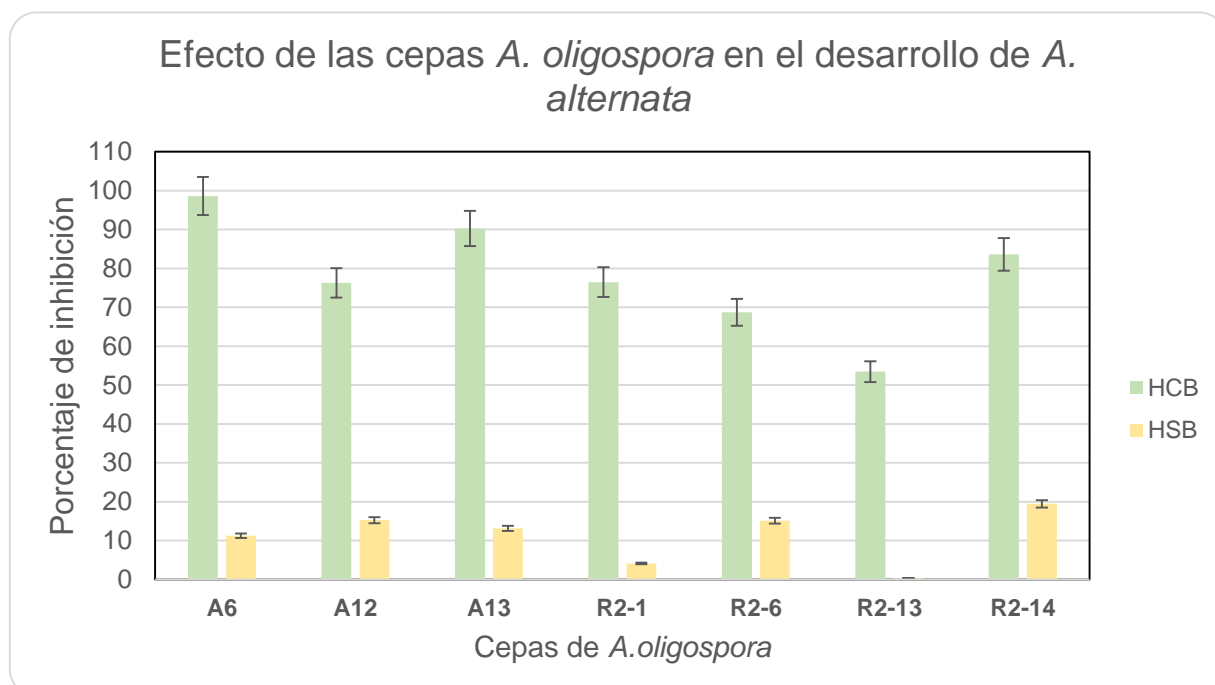


Figura 20. Inhibición de crecimiento de *A.alternata*. Medios de cultivo PDA cubiertos con membranas de celofán se inocularon con discos de micelio (5 mm) de las cepas de *A. oligospora* con bacterias asociadas (HCB) y sin bacterias asociadas (HSB) indicadas en la imagen. Se incubaron 4 días a 28°C, se retiró el celofán con micelio y se inoculó con discos de micelio de *A.alternata*. Como control el fitopatógeno se cultivó en placas de PDA sin tratamiento. En las columnas se muestran las cepas con las que se trabajó y en las filas el tratamiento de hongo asociado con bacterias (HCB) y hongo sin bacterias (HSB).



Grafica 2. Capacidad antagonica de *A. oligospora* sobre *A. alternata*. El ensayo de antagonismo se realizó por triplicado, para obtener un promedio de inhibición y la variación experimental expresada en la desviación estándar. Los cultivos se incubaron a 28°C durante 5 días. Barras de error indican la desviación estándar.

Tomando en cuenta los resultados previos acerca de la medición de la capacidad antagonica de *A. oligospora* asociada con bacterias frente a diferentes fitopatógenos, se realizó un experimento para determinar el grado de inhibición por parte de las

cepas de *A.oligospora* asociadas con bacterias y sin bacterias, esto para poder profundizar acerca de la actividad antagónica que presenta cada organismo sobre el fitopatógeno *A.alternata*, dado que en el experimento previo este hongo había sido uno de los organismos con mayor porcentaje de inhibición. Como se observa en la figura 20, el crecimiento por parte de *A.alternata* después de estar sometido al tratamiento de *A.oligospora* sin bacterias es muy similar al control. Por otra parte, en el tratamiento de *A.oligospora* con bacterias asociadas *A.alternata* se ve prácticamente inhibido en un 100% por cepas como la A6,A12,A13 y R2-1, este resultado indica que el organismo con mayor potencial de biocontrol para este fitopatógeno es *B. amyloliquefaciens*. Así mismo, se puede apreciar en la gráfica 2 el porcentaje de inhibición por parte de las cepas de *A.oligospora* con y sin bacterias asociadas, siendo las cepas con bacterias asociadas las que presentan un mayor poder inhibitorio, en especial por parte de las cepas A6 y A13, la capacidad inhibitoria por parte de las cepas sin bacterias asociadas resulto ser mínima en comparación con las cepas con bacterias asociadas, sin embargo, las cepas con mayor grado de inhibición fueron la R2-14 y la A12.

9 Discusión

9.1 Identificación de bacterias asociadas al hongo nematófago *A. oligospora*

En los ecosistemas naturales podemos encontrar una inmensidad de interacciones entre organismos de la rizosfera como por ejemplo entre hongos y bacterias. En 1998 se presentó uno de los primeros reportes de *A. oligospora* con bacterias, en donde algunas bacterias que se encontraban cerca de cierta cepa de *A. oligospora* aislada del suelo de Senegal, fueron aisladas para probar la capacidad que tenían estas para disminuir la población de nematodos y mejorar el crecimiento de las plantas, sin embargo, estas bacterias no se encontraban directamente asociadas, únicamente se encontraban coexistiendo en el mismo entorno (Duponnois, et al., 1998).

En este caso se sabe desde hace ya varios años que existen bacterias asociadas a hongos nematófagos, conocidas como bacterias ayudadoras de nematófagos o bien bacterias “helper”, estas bacterias son capaces de potenciar los sistemas involucrados en la depredación, esporulación y patogenicidad del hongo produciendo moléculas que actúan como puentes de unión entre el nematófago y el nematodo (Maciel, A. S. et al., 2009), si bien esto se ha reportado en varios hongos, es de especial interés la asociación con el hongo nematófago *A. oligospora* ya que este se ha propuesto como agente de biocontrol en varias regiones.

En 2014 se reportó que la urea secretada por bacterias provenientes de heces de vacas, específicamente de la especie *Stenotrophomonas maltophilia* actuaba como un gran potenciador para desencadenar un cambio en el ciclo de vida de *A. oligospora*, es decir, era capaz de inducir el cambio de fase de saprofito a depredador esto dado a las altas concentraciones que secretaba de este compuesto (Wang, et al., 2014).

Dos años más tarde, en 2016 Li y colaboradores presentaron el primer reporte de bacterias pertenecientes al género de *Stenotrophomonas* y *Rhizobium* asociadas a *A. oligospora* formando biofilms en sus hifas potenciando así la formación de trampas.

Tomando esto en cuenta era de gran interés lograr identificar qué tipo de bacteria se encontraba en las siete cepas de *Arthrobotrys oligospora* variedad

queretana, pues como se había visto existe más de un género de bacterias asociadas a este nematófago. Después de lograr aislar y caracterizar las bacterias mediante pruebas bioquímicas, se optó por realizar un análisis de secuenciación en donde se encontró que las siete cepas de *Arthrobotrys oligospora* var queretana presentaron una íntima asociación con bacterias, identificadas como *Bacillus amyloliquefaciens*.

Después de realizar un análisis exhaustivo del estado del arte, este trabajo es el primero que demuestra esta asociación *Arthrobotrys oligospora* - *Bacillus amyloliquefaciens*. Analizando el origen de las muestras no existe una correlación con base en la localidad, las bacterias fueron colectadas de la siguiente manera: A6, A12 y A13 del municipio de El Marqués a partir de tierra debajo de un árbol, composta y heces de ovino respectivamente, mientras que las cepas R2-1, R2-6, R2-13 y R2-14 fueron colectadas y aisladas del municipio de Jalpan de Serra a partir de heces de burro, de ovino, de bovino y composta respectivamente (Arroyo-Balán F, et al., 2021). Tomando esto como referencia se hubiera esperado que dentro de las cepas A (A6, A12 y A13) hubiera existido una menor variabilidad genética, al igual que con las cepas R (R2-1, R2-6, R2-13 y R2-14), sin embargo, como se observa en las figuras 14 y 15, si bien no existe una gran variabilidad genética entre las siete cepas, la cepa A12 y R2-13 presentan una menor variabilidad genética entre ellas a pesar de haber sido colectadas a partir de muestras y municipios diferentes.

Bacillus amyloliquefaciens, es una bacteria grampositiva formadora de esporas, esten el suelo, puede colonizar la rizosfera de las plantas y crecer en condiciones de estrés. Se ha explorado como un agente no tóxico y ecológico para estimular el crecimiento de las plantas (Chen et al., 2007; Qiao et al., 2014). Como una de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), el BA se considera un excelente agente para explorar biofertilizantes y biocontrol en la agricultura y se utiliza para mejorar la tolerancia de las plantas contra el estrés biótico y abiótico (Gamez et al., 2019; Dimopoulou et al., 2021; Kazerooni et al., 2021). Se ha aplicado ampliamente a plantas como el arroz, la sandía, el pepino y el tabaco (Luo, et al., 2022).

La interacción de *A. oligospora* con *B. amyloliquefaciens* es muy interesante y puede representar una formula biológica natural para ampliar su hábitat y su cadena trófica, asegurando su éxito en diferentes ambientes. Actualmente se sabe que ciertas especies pertenecientes al género *Bacillus* como: *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* y *Bacillus amyloliquefaciens* actúan como potenciales organismos antagónicos frente a

patógenos como *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Botrytis cinerea* ya que son capaces de inhibir y retardar el desarrollo de estos hongos mediante la producción de varios compuestos orgánicos volátiles así como por la secreción de enzimas líticas (Ramírez, et al., 2022). Tomando esto en cuenta, en los últimos años varias cepas de *B. amyloliquefaciens* son comercializadas y aplicadas en los sistemas agrícolas para la promoción de crecimiento de las plantas y proteger los cultivos de los hongos fitopatógenos (Chowdhury et al., 2017). Para fortalecer nuestra hipótesis analizamos la actividad antagónica de las cepas *A. oligospora* asociadas con bacterias demostrando que efectivamente son fuertes antagonistas de hongos fitopatógenos principalmente de *Alternaria alternata* y *Sclerotium rolfsii*.

A. alternata es uno de los hongos fitopatógenos de mayor importancia económica dentro del sector agrícola por su capacidad para infectar hojas, frutos y nuevos brotes, dando como resultado necrosis, defoliación, un ciclo de crecimiento más corto e incluso una descomposición post cosecha, dada su amplia gama de huéspedes y su propagación activa se han buscado distintas formas de eliminar este patógeno, sin embargo, el constante empleo de pesticidas químicos como: mancozeb, daconil y captafol ha dado como resultado una resistencia (Wang, et al., 2020). Por otra parte, *S. rolfsii* es un patógeno generalista capaz de infectar a más de 500 especies de plantas incluidas unas de gran importancia económica como lo es el jitomate, la cebolla, garbanzos entre otras, dado su capacidad para crecer en un rango de temperaturas desde los 25 hasta los 40 y su producción de esclerotios lo vuelve un fitopatógeno altamente persistente y difícil de erradicar (You, et al., 2020)

Más interesante fue el demostrar que los hongos curados fueron incapaces de inhibir el desarrollo de *A. alternata*, indicando que las bacterias *B. amyloliquefaciens* presentan un alto potencial antagónico contra hongos fitopatógenos. Nuestros hallazgos muestran evidencia de la presencia natural de asociaciones biológicas que impactan a mayor escala las interacciones bióticas en el ambiente.

Las cepas de *A. oligospora* var queretana presentaron alta actividad depredadora contra el nemátodo de importancia veterinaria *Haemonchus contortus* (Arroyo-Balan et al., 2021). Además, *A. oligospora* es un nematófago generalista con gran potencial para el control de nemátodos patógenos de animales y plantas (Yang et al., 2020). Nuestros hallazgos demuestran que la asociación de *A. oligospora* con bacterias no solo impacta en la capacidad depredadora cuando se asocia con las

bacterias “helper”, sino en ampliar si cadena trófica con mayor trascendencia ecológica.

A.alternata es un fitopatógeno de gran importancia económica dentro del sector agrícola dado que causa un enfermedad conocida como el tizón temprano, de manera que lograr una inhibición o una reducción en su crecimiento de manera in vitro como se observó en la figura 20 y en la gráfica 2 permite considerar las cepas de *A.oligospora* con bacterias asociadas como un agente de biocontrol viable para el control de este fitopatógeno.

10 Conclusión

Los análisis filogenéticos arrojaron que las siete cepas bacterianas aisladas son *B. amyloliquefaciens* y que a pesar de haber sido aisladas de diferentes municipios son genéticamente muy similares, lo cual podría implicar un establecimiento por parte de esta bacteria en todo el estado de Querétaro.

Las cepas de *A. oligospora* provenientes de El Marqués y Jalpan de Serra demostraron una interacción con *B. amyloliquefaciens*, lo cual estaría considerado como el primer reporte de este nematófago con esta bacteria Gram negativa.

La asociación de *A. oligospora* con *B. amyloliquefaciens* actúa como un potente antagonista de hongos fitopatógenos de importancia económica.

11 Perspectivas

En este proyecto se lograron aislar siete cepas bacterianas a partir de cepas de *Arthrobotrys oligospora* colectadas en el municipio de El Marquésy Jalpan de Serra previamente a raíz de un proyecto, las cepas se identificaron como *Bacillus amyloliquefaciens*, sin embargo, existen más cepas de *A.oligospora* del proyecto previamente mencionado que no han sido analizadas, considerando que esas cepas son asiladas a partir de diferentes muestras, es necesario verificar si estas también cuentan con la presencia de bacterias asociadas y si es así, asilarlas para posteriormente identificarlas y determinar si también se trata de *Bacillus amyloliquefaciens*, si es alguna otra especie previamente reportada o bien es alguna especie nunca antes reportada con el nematófago.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en las pruebas de antagonismo de las cepas de *A.oligospora* asociados con sus respectivas cepas bacterianas, es necesario profundizar que organismo es el que tiene un mayor potencial inhibitorio

frente a los fitopatógenos, si es el hongo curado, si son las bacterias aisladas o si bien el potencial viene de estos dos organismos asociados, de manera que es necesario realizar pruebas, principalmente para los fitopatógenos *Alternaria alternata* y *Sclerotium rolfsii* en donde por parte de las siete cepas hubo un porcentaje de inhibición mayor al 50% con *A. oligospora* curado y con las bacterias aisladas para comparar si el porcentaje de inhibición se mantiene, aumenta o disminuye.

Así mismo es necesario realizar estudios que involucren al nematodo, ya que, si bien esta reportado que las bacterias asociadas a hongos nematófagos potencian la formación de trampas, así como la esporulación y secreción de moléculas que actúan como puentes de unión entre el nematófago y el nematodo es necesario determinar si *Bacillus amyloliquefaciens* también potencia los mecanismos previamente mencionados o bien tiene algún otro efecto sobre *A. oligospora* al momento de depredar, de igual forma es necesario comparar el efecto y poder depredador de las cepas del nematófago curado y con las bacterias asociadas.

12 Bibliografía

- Aguilar-Marcelino, L., Mendoza-de-Gives, P., Al-Ani, L. K. T., López-Arellano, M. E., Gómez-Rodríguez, O., Villar-Luna, E., & Reyes-Guerrero, D. E. (2020). Using molecular techniques applied to beneficial microorganisms as biotechnological tools for controlling agricultural plant pathogens and pest. In *Molecular Aspects of Plant Beneficial Microbes in Agriculture* (pp. 333-349). Academic Press.
- Al-Hakeem, A. M., Al-Molla, S. A., & Al-Tarjuman, J. K. (2022). Nematophagous Fungi. *Texas Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 5, 37-42.
- Andrews J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 48 Suppl 1, 5–16. https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl_1.5
- Arroyo-Balán, F., Landeros-Jaime, F., González-Garduño, R., Cazapal-Monteiro, C., Arias-Vázquez, M. S., Aguilar-Tipacamú, G., ... & Mosqueda, J. (2021). High Predatory Capacity of a Novel *Arthrobotrys oligospora* Variety on the Ovine Gastrointestinal Nematode *Haemonchus contortus* (Rhabditomorpha: Trichostrongylidae). *Pathogens*, 10(7), 815.
- Bonfante, P., Venice, F., & Lanfranco, L. (2019). The mycobiota: fungi take their place between plants and bacteria. *Current opinion in microbiology*, 49, 18-25.}
- Chowdhury, S. P., Hartmann, A., Gao, X., & Borriss, R. (2015). Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 – a review. *Frontiers in Microbiology*, 6. doi:10.3389/fmicb.2015.00780
- Curl, C. L., Spivak, M., Phinney, R., & Montrose, L. (2020). Synthetic pesticides and health in vulnerable populations: agricultural workers. *Current environmental health reports*, 7, 13-29.
- Dai, Z., Gan, Y., Zhao, P., & Li, G. (2022). Secondary Metabolites from the Endoparasitic Nematophagous Fungus *Harposporium anguillulae* YMF 1.01751. *Microorganisms*, 10(8), 1553.
- De Freitas Soares, F. E., Sufiate, B. L., & de Queiroz, J. H. (2018). Nematophagous fungi: Far beyond the endoparasite, predator and ovicidal groups. *Agriculture and Natural Resources*, 52(1), 1-8.
- Devi, G. (2018). Utilization of nematode destroying fungi for management of plant-parasitic nematodes-a review. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 15(2), 377-396.

- Dijksterhuis, J., Veenhuis, M., Harder, W., & Nordbring-Hertz, B. (1994). Nematophagous fungi: physiological aspects and structure–function relationships. *Advances in microbial physiology*, 36, 111-143.
- Doehlemann, G., Ökmen, B., Zhu, W., & Sharon, A. (2017). Plant pathogenic fungi. *Microbiology spectrum*, 5(1), 5-1.
- Doolotkeldieva, T., Bobushova, S., Muratbekova, A., Schuster, C., & Leclercq, A. (2021). Isolation, Identification, and Characterization of the Nematophagous Fungus *Arthrobotrys oligospora* from Kyrgyzstan. *Acta Parasitologica*, 66(4), 1349-1365.
- Duponnois, R., Ba, A. M., & Mateille, T. (1998). Effects of some rhizosphere bacteria for the biocontrol of nematodes of the genus *Meloidogyne* with *Arthrobotrys oligospora*. *Fundamental and Applied Nematology*, 21(2), 157-163.
- Faris, J. D., & Friesen, T. L. (2020). Plant genes hijacked by necrotrophic fungal pathogens. *Current Opinion in Plant Biology*, 56, 74-80.
- Liu, K., Zhang, W., Lai, Y., Xiang, M., Wang, X., Zhang, X., & Liu, X. (2014). *Drechlerella stenobrocha* genome illustrates the mechanism of constricting rings and the origin of nematode predation in fungi. *Bmc Genomics*, 15(1), 1-14.
- Haard, K. (1968). Taxonomic studies on the genus *Arthrobotrys* Corda. *Mycologia*, 60(6), 1140-1159.
- Herrera-Estrella, A., Casas-Flores, S., & Kubicek, C. P. (2016). 13 Nematophagous Fungi. In *Environmental and microbial relationships* (pp. 247-267). Springer, Cham.
- Huang, T. Y., Lee, Y. Y., Vidal-Diez de Ulzurrun, G., & Hsueh, Y. P. (2021). Forward genetic screens identified mutants with defects in trap morphogenesis in the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *G3*, 11(2), jkaa022.
- Ibrahim, H. M., Ahmad, E. M., Martínez-Medina, A., & Aly, M. A. (2019). Effective approaches to study the plant-root knot nematode interaction. *Plant physiology and Biochemistry*, 141, 332-342.
- Jiang, X., Xiang, M., & Liu, X. (2017). Nematode-trapping fungi. *Microbiology Spectrum*, 5(1), 5-1.

- Kumar, J., Ramlal, A., Mallick, D., & Mishra, V. (2021). An overview of some biopesticides and their importance in plant protection for commercial acceptance. *Plants*, 10(6), 1185.
- Li, L., Ma, M., Liu, Y., Zhou, J., Qu, Q., Lu, K., ... & Zhang, K. (2011). Induction of trap formation in nematode-trapping fungi by a bacterium. *FEMS microbiology letters*, 322(2), 157-165.
- Li, L., Yang, M., Luo, J., Qu, Q., Chen, Y., Liang, L., & Zhang, K. (2016). Nematode-trapping fungi and fungus-associated bacteria interactions: the role of bacterial diketopiperazines and biofilms on *Arthrobotrys oligospora* surface in hyphal morphogenesis. *Environmental Microbiology*, 18(11), 3827-3839.
- Liou, G. Y., & Tzean, S. S. (1997). Phylogeny of the genus *Arthrobotrys* and allied nematode-trapping fungi based on rDNA sequences. *Mycologia*, 89(6), 876-884.
- Liu, K., Tian, J., Xiang, M., & Liu, X. (2012). How carnivorous fungi use three-celled constricting rings to trap nematodes. *Protein & cell*, 3(5), 325-328.
- Liu, X., Xiang, M., & Che, Y. (2009). The living strategy of nematophagous fungi. *Mycoscience*, 50(1), 20-25.
- Luo, L., Zhao, C., Wang, E., Raza, A., & Yin, C. (2022). *Bacillus amyloliquefaciens* as an excellent agent for biofertilizer and biocontrol in agriculture: An overview for its mechanisms. *Microbiological research*, 259, 127016. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127016>
- Maciel, A. S., Araújo, J. V., Campos, A. K., Lopes, E. A., & Freitas, L. G. (2009). Predation of *Ancylostoma* spp. dog infective larvae by nematophagous fungi in different conidial concentrations. *Veterinary parasitology*, 161(3-4), 239–247. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.01.015>
- Maciel, A. S., Araújo, J. V., Campos, A. K., Benjamin, L. A., & Freitas, L. G. (2009). Scanning electron microscopy of *Ancylostoma* spp. dog infective larvae captured and destroyed by the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans*. *Micron*, 40(4), 463-470.
- Mehtap, K., Ezgi, Ö., Tugce, B., Fatma, K. E., & Gul, O. (2021). Benomyl induced oxidative stress related DNA damage and apoptosis in H9c2 cardiomyoblast cells. *Toxicology in Vitro*, 75, 105180.

- Minerdi, D., Moretti, M., Gilardi, G., Barberio, C., Gullino, M. L., & Garibaldi, A. (2008). Bacterial ectosymbionts and virulence silencing in a *Fusarium oxysporum* strain. *Environmental Microbiology*, 10(7), 1725-1741.
- Olanrewaju, O. S., Glick, B. R., & Babalola, O. O. (2017). Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World journal of microbiology & biotechnology*, 33(11), 197. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2364-9>
- Organización De Las Naciones Unidas Para La Agricultura Y La Alimentación. ORG. (2000). Mejorando la nutrición a través de huertos y granjas familiares. Producido por el departamento de agricultura. Cartilla, (20).
- Pérez Oviedo, A. (2014). Estandarización de preservantes y técnicas de conservación de hongos nematófagos para el control de nematodos gastrointestinales en bovinos. Retrieved from https://ciencia.lasalle.edu.co/medicina_veterinaria/53
- Quevedo, A., Magdama, F., Castro, J., & Vera-Morales, M. (2022). Ecological interactions of nematophagous fungi and their potential use in tropical crops.
- Ramírez, V., Martínez, J., Bustillos-Cristales, M. D. R., Catañeda-Antonio, D., Munive, J. A., & Baez, A. (2022). *Bacillus cereus* MH778713 elicits tomato plant protection against *Fusarium oxysporum*. *Journal of applied microbiology*, 132(1), 470–482. <https://doi.org/10.1111/jam.15179>
- Rani, L., Thapa, K., Kanojia, N., Sharma, N., Singh, S., Grewal, A. S., ... & Kaushal, J. (2021). An extensive review on the consequences of chemical pesticides on human health and environment. *Journal of Cleaner Production*, 283, 124657.
- Roeber, F., Jex, A. R., & Gasser, R. B. (2013). Impact of gastrointestinal parasitic nematodes of sheep, and the role of advanced molecular tools for exploring epidemiology and drug resistance-an Australian perspective. *Parasites & vectors*, 6(1), 1-13.
- Rodríguez, P. A., & Arenas, R. (2018). Hans Christian Gram y su tinción. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*, 16(2), 166-167
- Saberi Riseh, R., Skorik, Y. A., Thakur, V. K., Moradi Pour, M., Tamanadar, E., & Noghabi, S. S. (2021). Encapsulation of plant biocontrol bacteria with alginate as a main polymer material. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(20), 11165.

- Su, H., Zhao, Y., Zhou, J., Feng, H., Jiang, D., Zhang, K. Q., & Yang, J. (2017). Trapping devices of nematode-trapping fungi: formation, evolution, and genomic perspectives. *Biological Reviews*, 92(1), 357-368.
- Suratman, S., Edwards, J. W., & Babina, K. (2015). Organophosphate pesticides exposure among farmworkers: pathways and risk of adverse health effects. *Reviews on environmental health*, 30(1), 65-79.
- Talavera-Ortiz, A., Chaverri, P., Díaz-Godínez, G., Acosta-Urdapilleta, M., Villegas, E., & Téllez-Téllez, M. (2020). Mycelial inhibition of *Trichoderma* spp.(Hypocreaceae) isolated from the cultivation of *Pleurotus ostreatus* (Pleurotaceae) with an extract of *Pycnoporus* sp.(Polyporaceae). *Acta botánica mexicana*, (127).
- Tudi, M., Daniel Ruan, H., Wang, L., Lyu, J., Sadler, R., Connell, D., ... & Phung, D. T. (2021). Agriculture development, pesticide application and its impact on the environment. *International journal of environmental research and public health*, 18(3), 1112.
- Vazquez-Angulo, J.C., Mendez-Trujillo, V., González-Mendoza, D., Morales-Trejo, A., Grimaldo-Juarez, O., Cervantes-Díaz, L., 2012. Methodology A rapid and inexpensive method for isolation of total DNA from *Trichoderma* spp (Hypocreaceae). *Genet. Mol. Res.* 11, 1379–1384.
- Wan, J., Dai, Z., Zhang, K., Li, G., & Zhao, P. (2021). Pathogenicity and metabolites of endoparasitic nematophagous fungus *Drechmeria coniospora* YMF1. 01759 against nematodes. *Microorganisms*, 9(8), 1735.
- Wang, C. Y., Fang, Z. M., Sun, B. S., Gu, L. J., Zhang, K. Q., & Sung, C. K. (2008). High infectivity of an endoparasitic fungus strain, *Esteya vermicola*, against nematodes. *The Journal of Microbiology*, 46(4), 380-389.
- Wang, L. T., Lee, F. L., Tai, C. J., & Kuo, H. P. (2008). *Bacillus velezensis* is a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 58(3), 671-675.
- Wang, R., Dong, L., Chen, Y., Qu, L., Wang, Q., & Zhang, Y. (2017). *Esteya vermicola*, a nematophagous fungus attacking the pine wood nematode, harbors a bacterial endosymbiont affiliated with Gammaproteobacteria. *Microbes and environments*, ME16167.

- Wang, R., Zhao, P., Ge, X., & Tian, P. (2020). Overview of *Alternaria alternata* Membrane Proteins. *Indian journal of microbiology*, 60(3), 269–282. <https://doi.org/10.1007/s12088-020-00873-8>
- Wang, X., Li, G. H., Zou, C. G., Ji, X. L., Liu, T., Zhao, P. J., ... & Zhang, K. Q. (2014). Bacteria can mobilize nematode-trapping fungi to kill nematodes. *Nature communications*, 5(1), 1-9.
- Witt, L. S., Spicer, J. O., Burd, E., Kraft, C. S., & Babiker, A. (2021). Evaluation of clinicians' knowledge and use of minimum inhibitory concentration values. *The Brazilian journal of infectious diseases: an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, 25(6), 101656. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2021.101656>
- WoldemariamYohannes, K., Wan, Z., Yu, Q., Li, H., Wei, X., Liu, Y., ... & Sun, B. (2020). Prebiotic, probiotic, antimicrobial, and functional food applications of *Bacillus amyloliquefaciens*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(50), 14709-14727.
- Woodrow, J. E., Gibson, K. A., & Seiber, J. N. (2019). Pesticides and related toxicants in the atmosphere. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* Volume 247, 147-196.
- Xue-Mei Niu & Ke-Qin Zhang (2011) *Arthrobotrys oligospora*: a model organism for understanding the interaction between fungi and nematodes, *Mycology*, 2:2, 59-78, DOI: 10.1080/21501203.2011.562559
- Yang C.T., de Ulzurrun G.V., Goncalves A.P., Lin H.C., Chang C.W., Huang T.Y., Chen S.A., Lai C.K., Tsai I.J., Schroeder F.C., et al. Natural diversity in the predatory behavior facilitate the stablishment of a robust model strain for nematode-trapping fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*
- You, J., Tang, T., Wang, F., Mao, T., Yuan, B., Guo, J., Guo, X., Duan, Y., & Huang, J. (2021). Baseline Sensitivity and Control Efficacy of Strobilurin Fungicide Pyraclostrobin Against *Sclerotium rolfsii*. *Plant disease*, 105(11), 3503–3509. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-21-0176-RE>
- Zajac, A. M., & Garza, J. (2020). Biology, epidemiology, and control of gastrointestinal nematodes of small ruminants. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 36(1), 73-87.
- Zhang, W., Cheng, X., Liu, X., & Xiang, M. (2016). Genome studies on nematophagous and entomogenous fungi in China. *Journal of Fungi*, 2(1), 9.

- Zhang, Y., Yang, G., Fang, M., Deng, C., Zhang, K. Q., Yu, Z., & Xu, J. (2020). Comparative analyses of mitochondrial genomes provide evolutionary insights into nematode-trapping fungi. *Frontiers in Microbiology*, 11, 617.

13 Apéndices

Tabla 3. Especies del género *Bacillus* usadas como referencia para los análisis filogenéticos. Las secuencias usadas como referencia para los análisis filogenéticos fueron descargadas de la base de datos del NCBI y su número de acceso está indicado (Wang et al., 2007).

Especie	Cepa	Accession No.
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	11601	EF433406
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	14193	EF433408
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	14711	EF423607
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	17038	DQ993675
<i>Bacillus atrophaeus</i>	17123	EF433409
<i>Bacillus atrophaeus</i>	17530	DQ993677
<i>Bacillus licheniformis</i>	11702	EF433410
<i>Bacillus licheniformis</i>	12826	EF423608
<i>Bacillus licheniformis</i>	14353	EF423609
<i>Bacillus licheniformis</i>	15413	DQ993676
<i>Bacillus mojavensis</i>	17124	EF433405
<i>Bacillus mojavensis</i>	17531	DQ993678
<i>Bacillus pumilus</i>	7061	AY876289
<i>Bacillus sonorensis</i>	17416	EF433411
<i>Bacillus sonorensis</i>	17532	DQ993679
<i>Bacillus subtilis</i>	10255	EF423595
<i>Bacillus subtilis</i>	14716	EF423595
<i>Bacillus subtilis</i>	17435	EF423598
<i>Bacillus subtilis subsp spizizenii</i>	10447	EF433403
<i>Bacillus subtilis subsp spizizenii</i>	17366	EF433402
<i>Bacillus vallismortis</i>	17183	EF433404
<i>Bacillus velezensis</i>	17467	EF433407

Secuencias obtenidas a partir de la secuenciación de Sanger usando como templado ADN de las bacterias previamente aisladas de las cepas de *A. oligospora*.

ANEXO 1: A6 (1415 nucleótidos)

GCTCCAAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGT
GTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCA
GCTTCACGCAGTCGAGTTGCAAACCTGCGATCCGAACCTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTT
AACCTCGCGGTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGCCCATTTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATA
AGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCACCTTA
GAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCC
AACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCCCCCGAAGGGG
ACGTCCTATCTCTAGGATTGTGAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTC
GAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCCTTTGAGTTTCAGTCT
TGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAAC
CCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCG
TCCCCACGCTTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGT
TCCTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACACGTGGAATTCACCTCTCCTCTTCTGCACTC
AAGTTCCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAG
AAACCGCCTGCGAGCCCTTTACGCCCAATAATTCGGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTAC
CGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCGCCCT
ATTTGAACGGCACTTGTTCTTCCCTAACAAACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACT
CACGCGGCGTTGCTCCGTGAGACTTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCG
TAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCCGCTACGCA
TCGTGCGCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCATCTGTAAG
TGGTAGCCGAAGCCACCTTTTATGTTTGAACCATGCGGTTCAAACAAGCATCCGGTATTAGC
CCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCC
GCCGCTAACATCAGGGAGCAAGCTCCCATCTGTCCGCTCGACTTGCATGTA

ANEXO 2: A12(1410 nucleótidos)

GCTCCAAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTG
TGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAG
CTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACCTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTTA
ACCTCGCGGTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGCCCATTTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAA
GGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCACCTTAG
AGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCA
ACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCCCCCGAAGGGGA
CGTCCTATCTCTAGGATTGTGAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCG
AATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCCTTTGAGTTTCAGTCTT
GCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACC
CCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCT
CCCCACGCTTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGT
CCTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACACGTGGAATTCACCTCTCCTCTTCTGCACTC
AAGTTCCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAG
AAACCGCCTGCGAGCCCTTTACGCCCAATAATTCGGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTAC
CGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCGCCCT
ATTTGAACGGCACTTGTTCTTCCCTAACAAACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACT

CACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCG
TAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTTCGGCTACGCA
TCGTGCGCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCATCTGTAAG
TGGTAGCCGAAGCCACCTTTTATGTTTGAACCATGCGGTTCAAACAAGCATCCGGTATTAGC
CCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCC
GCCGCTAACATCAGGGAGCAAGCTCCCATCTGTCCGCTCGACTTGC

ANEXO 3: A13(1409 nucleótidos)

GCTCCAAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGG
TGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATT
CCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACAGATTGTGGGATT
GGCTTAACCTCGCGGTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCA
GGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCA
GTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCG
GGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCT
GCCCCGAAGGGGACGTCCTATCTCTAGGATTGTGAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGT
TCTTCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATT
CCTTTGAGTTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGC
AGCACTAAGGGGCGGAAACCCCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACC
AGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAG
AGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACACGTGG
AATTCCACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGA
GCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGAGCCCTTTACGCCCAATAATT
CCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCT
TTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCGCCCTATTTGAACGGCACTTGTCTTCCCTAACA
ACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTC
GTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTC
CCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTTCGGCTACGCATCGTCGCCTTGGTGAGCCGTAC
CTCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCATCTGTAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTTT
ATGTTTGAACCATGCGGTTCAAACAAGCATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTAT
CCCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAACATCAGGGA
GCAAGCTCCCATCTGTCCGCTCGACTTGC

ANEXO 4: R2-1(1407 nucleótidos)

CTCCAAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGG
TGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATT
CCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACAGATTGTGGGATT
GGCTTAACCTCGCGGTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCA
GGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCA
GTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCG
GGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCT
GCCCCGAAGGGGACGTCCTATCTCTAGGATTGTGAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGT
TCTTCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATT
CCTTTGAGTTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGC
AGCACTAAGGGGCGGAAACCCCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACC
AGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAG
AGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACACGTGG
AATTCCACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGA
GCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGAGCCCTTTACGCCCAATAATT

CCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCT
TTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCGCCCTATTTGAACGGCACTTGTTCTTCCCTAACA
ACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTACAGACTTTC
GTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCGGTGTCTCAGTC
CCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTGGCTACGCATCGTCGCCTTGGTGAGCCGTAC
CTCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCATCTGTAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTTT
ATGTTTGAACCATGCGGTTCAAACAAGCATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTAT
CCCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTACCCGTCCGCCGCTAACATCAGGGA
GCAAGCTCCCATCTGTCCGCTCGACTT

ANEXO 5: R2-6(1409 nucleótidos)

GCTCCAAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTGACGGGCG
GTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGAT
TCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAAGTGAAGACAGATTTGTGGGAT
TGGCTTAACCTCGCGGTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGCCCATTTGTAGCACGTGTGTAGCCC
AGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGC
AGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGC
GGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTC
TGCCCCCGAAGGGGACGTCCTATCTCTAGGATTGTCAAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGG
TTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAAT
TCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTG
CAGACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTAC
CAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCA
GAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCCGCTACACGTG
GAATTCACCTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGACCCCTCCCCGGTTG
AGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGAGCCCTTTACGCCCAATAAT
TCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGC
TTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCGCCCTATTTGAACGGCACTTGTTCTTCCCTAAC
AACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTACAGACTTT
CGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCGGTGTCTCAGT
CCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTGCGCTACGCATCGTCGCCTTGGTGAGCCGTTA
CCTCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCATCTGTAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTT
TATGTTTGAACCATGCGGTTCAAACAAGCATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTA
TCCCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTACCCGTCCGCCGCTAACATCAGGG
AGCAAGCTCCCATCTGTCCGCTCGACTTG

ANEXO 6: R2-13(1392)

GCTCCAAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGG
TGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATT
CCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAAGTGAAGACAGATTTGTGGGATT
GGCTTAACCTCGCGGTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGCCCATTTGTAGCACGTGTGTAGCCCA
GGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCA
GTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCG
GGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCT
GCCCCCGAAGGGGACGTCCTATCTCTAGGATTGTCAAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGT
TCTTCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATT
CCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGC
AGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACC
AGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAG
AGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCCGCTACACGTGG

AAATTCCACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTG
AGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGAGCCCTTTACGCCAATAAT
TCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGC
TTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCGCCCTATTTGAACGGCACTTGTTCTTCCCTAAC
AACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTACAGACTTT
CGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGT
CCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTCGCCTTGGTGAGCCGTTA
CCTCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCATCTGTAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTT
TATGTTTGAACCATGCGGTTCAAACAAGCATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTA
TCCCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAACATCAGGG
AGCAAGCTCCCA

ANEXO 7: R2-14(1407)

AAAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTA
CAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACAAGCGATTCCAGCTTC
ACGCAGTCAAGTTGCAAACCTGCGATCCGAACCTGAAAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACCT
CGCGGTTTCCCTGCCCTTTGTTCTGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGG
CATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCACCTTAAAGTG
CCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACAT
CTCACGACACGAGCTGACAACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCCCCCGAAGGGGACGTC
CTATCTCTAGGATTGTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCCAATT
AAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGA
CCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCCCT
AACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCC
ACGCTTTTCGCACATCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCTTCGCCCACTGGTGTTTCT
CCACATCTCTACGCATTTACACGCTACACGTGGAATTCCACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGT
TCTCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAA
CCGCCTGCGAGCCCTTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGC
GGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCGCCATATT

TGAACGGCACTTGTTCTTCTTAACAACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCAC
GGGGCGTTGTTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAG
GAGTTTGGGCCGTGTTTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTTTTCAGGTGGGTTACGCATCG
TCGCCTTGGTGAGCCGTTACCTACCAACTAGTTAATGCGCCGCGGGTCCATCTGTAAGTGG
TAGCCGAAGCCACCTTTTATGTGTGAACCATGCGGTTCAAACAAGCATCCGGTATTAGCCCC
GGTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCTTACAGGCAGGTTACACACGTGTTACTCACCCGTCCGCC
GATAACATCAGGGAGCAAGTTCCCATCTGTTTCGCTCGACTTGC