

SUSCEPTIBILIDAD *IN VITRO* DE *PESTALOTIOPSIS* SPP. A NANOPARTICULAS DE COBRE

Jiménez Ramírez Teresa Vianey (1), Flores Villavicencio Lérica Liss (2), Gómez Ortiz Nikte (3), Limón Corona Mónica (6), Pichardo Molina Juan Luis (3), Sánchez Ramos Sanjuana (1), Cruz Jiménez Gustavo (4), Villagómez Castro Julio César (2), Virgen Calleros Gil (5), Castruita Domínguez José Pedro (6)

1 [Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico Superior de Irapuato] | [vianey.jimenezr92@gmail.com, sansachez@itesi.edu.mx]

2 [Departamento de Biología, DCNE campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [leri_oo@hotmail.com, castroj2407@hotmail.com]

3 [Centro de Investigaciones en Óptica, A. C. León, Gto] | [jpichardo@cio.mx]

4 [Departamento de Farmacia, DCNE campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [cruzg@ugto.mx]

5 [Departamento de Producción Agrícola, CUCBA, Universidad de Guadalajara] | [gvirgen@cucba.udg.mx]

6 [Departamento de Ecología, CUCBA, Universidad de Guadalajara] | [casdompe@hotmail.com]

Resumen

Las nanopartículas muestran una amplia gama de propiedades químicas, ópticas, eléctricas y biológicas, en este aspecto se ha reportado que las Nanopartículas de cobre (NPsCu) presentan un amplio espectro de actividad antibacterial y antifúngica. El género *Pestalotiopsis* spp., es un hongo fitopatógeno causante de cáncer de tallo en *Vaccinium corymbosum* (Arándano azul), México ocupa el cuarto lugar como país productor a nivel mundial. En este estudio, *Pestalotiopsis* spp. fue expuesto por 24 -120h a NPsCu. Después del tratamiento, se observaron alteraciones morfológicas en las hifas (Tinción Blanco de Calcofluor) y la actividad metabólica mitocondrial (ensayo XTT) fue dependiente de la concentración y el tiempo de exposición. Por otra parte, plántulas de *V. corymbosum* se expusieron a concentraciones de 0.125 y 2 g/L de NPsCu en medio Hoagland por 8 días con ciclos de luz/oscuridad a 28°C. Posteriormente, se determinó el contenido de la clorofila (SPAD-502) y la longitud del tallo, indicando que no existen cambios significativos independientemente de la concentración de las NPsCu. Estos datos sugieren, que las NPsCu pueden ser una alternativa como fungicida contra *Pestalotiopsis* spp. para sostener la producción comercial de arándano azul.

Abstract

Nanoparticles show a wide range of chemical, optical, electrical and biological properties, in this aspect it has been reported that the copper nanoparticles (NPsCu) have a broad spectrum of antibacterial and antifungal activity. The genus *Pestalotiopsis* spp., is a phytopathogenic fungus that causes leaf spot and branch blight in *Vaccinium corymbosum* (Blueberry), Mexico ranks fourth as a producer country worldwide. In this study, *Pestalotiopsis* spp. was exposed for 24 -120h to NPsCu. After treatment, morphological alterations were observed in hyphae (Calcofluor White Stain) and mitochondrial metabolic activity (XTT assay) was dependent on concentration and time of exposure. On the other hand, *V. corymbosum* seedlings were exposed to concentrations of 0.125 and 2 g / L of NPsCu in Hoagland medium for 8 days with light / dark cycles at 28 °C. Subsequently, the content of chlorophyll (SPAD-502) and stem length were determined, indicating that there are no significant changes independently of the concentration of NPsCu. These data suggest, that NPsCu may be an alternative as fungicide against *Pestalotiopsis* spp. to sustain the commercial production of blueberry.

Palabras Clave

Pestalotiopsis spp.; *Vaccinium corymbosum*; Nanopartículas de cobre; Actividad metabólica; Clorofila

INTRODUCCIÓN

Nanopartículas de óxido de cobre (NPsCu) han recibido gran atención debido a sus interesantes propiedades fisicoquímicas y sus amplias aplicaciones que van desde su uso en fotocatalisis [1], sensores de gas [2], biosensores [3], fotodetectores [4] y como antifúngico, entre otras. Recientes reportes muestran el excelente poder antifúngico de estos nanomateriales en la preservación de alimentos, en la reducción del bio-deterioro de monumentos históricos [5, 6], así como en la eliminación de cepas patógenas y fitopatógenos resistentes que impactan la salud pública y veterinaria [7], y más recientemente en la agricultura [8].

Específicamente el género *Pestalotiopsis* spp., es un patógeno que ha sido reportado en cultivos de importancia agronómica, por ejemplo, en el aguacate, *Persea americana*, provoca una necrosis marrón oscuro de la pulpa a medida que maduran los frutos [9]. En el arándano azul, *Vaccinium corymbosum*, causa la mancha foliar [10] y el tizón de la rama [11]. Esta enfermedad ha sido reportada en 2016, como un problema emergente en la provincia de Anhui en China [12].

México ocupa el cuarto lugar como país productor de arándano azul a nivel mundial, con una producción total de 10,160.32 toneladas. Jalisco, Colima, Baja California y Michoacán aportan el 96 % de la producción total nacional de arándano azul en el país, el cual es exportado principalmente a Estados Unidos (SAGARPA, 2014).

En el presente trabajo se reporta los resultados preliminares del efecto antifúngico de NPsCu en *Pestalotiopsis* spp.

MATERIALES Y MÉTODOS

Nanopartículas de cobre

Las nanopartículas de óxido de cobre fueron sintetizadas por la Dra. Nikte M. Gómez Ortiz (CIO,

A.C. León, Gto.). Las NPsCu tienen un tamaño de 8 ± 2.8 nm.

Cultivo de *Pestalotiopsis* spp

Pestalotiopsis spp. fue crecido durante 10 días a 25°C en medio agar papa dextrosa natural, para la obtención de conidios. Posteriormente, los conidios fueron contados en cámara de Neubauer para los experimentos.

Exposición de *Pestalotiopsis* spp. a las NPsCu

Se sembraron 1×10^5 conidios/mL en medio Marthur en una placa de 96 pozos, posteriormente se realizó una dilución seriada iniciando con una concentración de 2 g/L. El control, consistió en conidios no expuestos a las NPsCu. La exposición a las NPsCu se analizó a 24, 48, 72, 96 y 120h /25°C. Posterior a la exposición se realizaron análisis bioquímicos y morfológicos, como a continuación se describe.

Determinación de la Actividad Metabólica por el Método de XTT

La actividad metabólica de *Pestalotiopsis* spp. expuesto a las NPsCu, se realizó por el método de XTT. Para esto, se adicionaron 100 μ L de una solución de 0.25 mg/mL XTT por cada pozo y se incubó a 25°C por 90 minutos. Después, el formazan fue cuantificado a 490nm (Espectrofotómetro Epoch BioTek).

Análisis morfológico de *Pestalotiopsis* spp. expuesto a las NPsCu

La diferenciación de conidios a micelio de *Pestalotiopsis* spp. y el efecto de las NPsCu sobre la morfología, fueron analizados en campo claro (Microscopio invertido Primo Vert, Carl Zeiss), además, se realizó una tinción con Blanco de Calcofluor y las muestras fueron observadas en un

microscopio de epifluorescencia (Leica, DMLS) con una cámara AxioCam ICc1 (Carl Zeiss) usando el filtro B (450-490nm).

Exposición de plántulas de *V. corymbosum* (Arándano azul) a las NPsCu

Se utilizaron plántulas de arándano azul de 8 meses de edad, crecidas en medio Murashige & Skoog. Las plántulas fueron expuestas a 0.125 y 2 g/L de NPsCu en medio Hoagland durante 7 días, con ciclos de luz/oscuridad a 28°C (Cámara Bioclimática Biotronette Mark III, Lab-Line). Plántulas no expuestas fueron usadas como control.

Determinación de clorofila y longitud del tallo

Después de la incubación con las NPsCu, se determinó el contenido relativo de clorofila (SPAD-502) en la zona apical, media y basal de la planta. Así mismo, se determinó la longitud del tallo de cada plántula.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Morfología de *Pestalotiopsis* spp.

La colonia de *Pestalotiopsis* spp. es de color blanco-amarillento (Fig. 1A), con producción de micelio denso, el cual tiene un aspecto algodonoso y un crecimiento radial cubriendo casi la totalidad de la placa, además es evidente destacar la presencia de acérvulos (puntos de color negro y de consistencia dura) (Fig. 1A). La morfología de los conidios utilizados en este estudio, presentan tres apéndices apicales y uno basal (Fig. 1B y C), es versicolor, fusiforme, con algunas partes negras y otras hialinas (Fig. 1C).



Figura 1. Morfología de *Pestalotiopsis* spp.

A. Cultivo monospórico, B. Conidio teñido con Blanco de Calcofluor, C. Campo claro

Determinación de la actividad metabólica de *Pestalotiopsis* spp. expuesto a las NPsCu

El análisis de medias de la actividad metabólica de *Pestalotiopsis* spp., indica una disminución de la viabilidad celular del hongo a partir de la concentración de 7.8×10^{-3} g/L, la cual fue dependiente del tiempo, siendo más evidente a las 72h (Fig. 2). Estos resultados están de acuerdo con previos reportes, donde indican la actividad antimicrobiana de NPsCu contra un amplio espectro de bacterias y hongos de importancia en medicina, agricultura y la industria [6, 7, 8, 9].

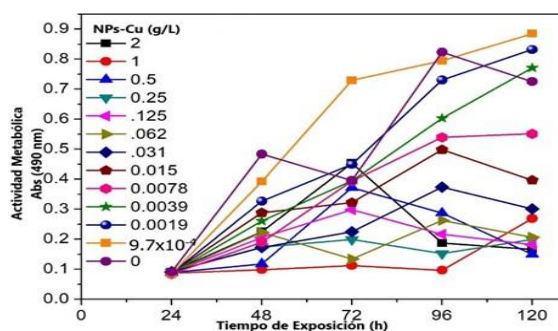


Figura 2. Actividad metabólica de *Pestalotiopsis* spp. expuesto a NPsCu.

Análisis del efecto de las NPsCu en la morfología de *Pestalotiopsis* spp.

Se ha reportado, que los efectos de las NPsCu en micrororganismos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*, es a nivel de la pared celular, sugiriendo la participación de los componentes celulares de la pared en la respuesta diferencial antimicrobiana ante las NPsCu [13].

Resultados similares se encontraron en *Pestalotiopsis* spp., en donde observamos una respuesta diferencial de las alteraciones morfológicas dependientes de la concentración y el tiempo. A concentraciones de 0.5 – 2 g/L NPsCu no se determinó una diferenciación del conidio a micelio (Fig. 3B), sin embargo, a concentraciones menores de 0.5 g/L se observó una diferenciación, pero las hifas se observaron cortas con protuberancias (Fig.3C y D) a diferencia del control (Fig. 3A).

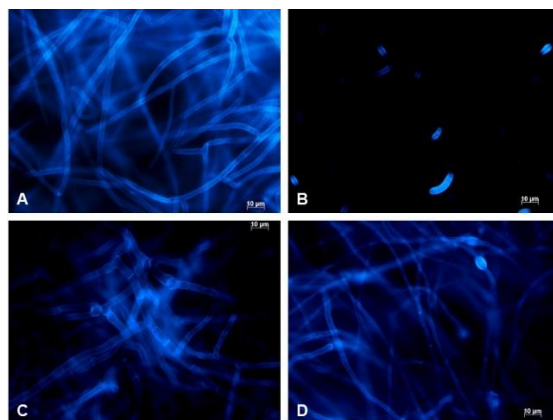


Figura 3. Morfología de *Pestalotiopsis* spp. expuesto a NPsCu por 72h. El micelio y conidios fueron teñidos con Blanco de Calcofluor, las imágenes son representativas de las alteraciones morfológicas, A. Control (no expuesto), B. 0.5 – 2g/L, C. 6.25x10⁻² – 0.25 g/L, D. 3.12x10⁻² – 9.75 x10⁻⁴ g/L

Análisis del contenido de clorofila en las plántulas de *V. corymbosum* expuestas a las NPsCu

El cobre es uno de los micronutrientes necesarios para las plantas. Se ha comprobado que el cobre activa ciertas enzimas implicadas en la síntesis de lignina y es esencial para diversos sistemas enzimáticos. También es necesario en el proceso de la fotosíntesis, esencial para la respiración de las plantas y coadyuvante de éstas en el metabolismo de carbohidratos y proteínas. Sin embargo, también se han reportado efectos fitotóxicos de las NPsCu, así como el análisis de la absorción, acumulación, distribución y efectos fisiológicos y bioquímicos de las NPsCu en diferentes plantas [14, 15]. Específicamente, la disminución en el contenido de la clorofila, retardo en el crecimiento de la raíz y tallo, aumento en la generación de especies reactivas de oxígeno, clorosis, transpiración reducida, entre otros. Por lo que, en este estudio se determinó el efecto de las NPsCu (0.125 y 2g/L) en *V. corymbosum* y se analizó el contenido de clorofila en diferentes regiones de la plántula: basal, media y apical (Fig. 4).

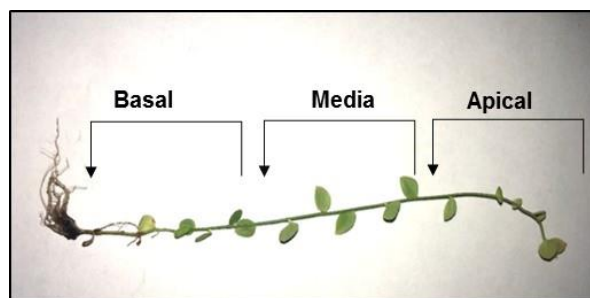


Figura 4. Determinación de las zonas de la plántula de *V. corymbosum* para la cuantificación de la clorofila

El análisis estadístico por el método de Tukey reveló que los tres grupos pertenecen al mismo grupo (Tabla 1). En el análisis de las zonas de la plántula se encuentran en el mismo grupo (Tabla 2). Los resultados indican que no existe una diferencia

significativa en el contenido de clorofila en las plántulas.

ZONA							
	Apical	Media	Basal	Media	Desviación Estándar	Agrupación	Valor P
0	12.9222	22.8333	19.0000	19.56	3.00	A	0.07
	17.0000	19.8444	20.7444				
	20.8333	21.6556	21.2444				
0.125	23.1000	17.9000	14.0000	20.30	3.25	A	
	18.6556	20.6333	19.1556				
	24.3000	23.3000	21.6556				
2	18.2556	22.1111	21.6778	23.15	3.62	A	
	21.2556	24.7889	25.4333				
	18.8222	27.9000	28.1333				

Tabla 1. Contenido de clorofila por grupos de exposición a las NPsCu

Zona	Clorofila	Media	Desviación Estándar	Grupo	Valor P
Apical	16.9185 ^a	19.46	3.41	A	0.22
	22.0185 ^b				
	19.4444 ^c				
Media	21.4444 ^a	22.33	2.90	A	
	20.6111 ^b				
	24.9333 ^c				
Basal	20.3296 ^a	21.25	3.99	A	
	18.2703 ^b				
	25.0814 ^c				

Tabla 2. Contenido de clorofila por zonas de la plántula. (a) Control, (b) 0.125 y (c) 2 g/L NPsCu

Determinación de la longitud del tallo de plántulas de *V. corymbosum* expuestas a las NPsCu

La longitud del tallo en las plántulas control fue de 7.99 cm, en el grupo con la concentración de 0.125 y 2 g/L NPsCu fue un promedio de 8.43 y 7.96 cm respectivamente; indicando que no existe una diferencia significativa en la longitud del tallo.

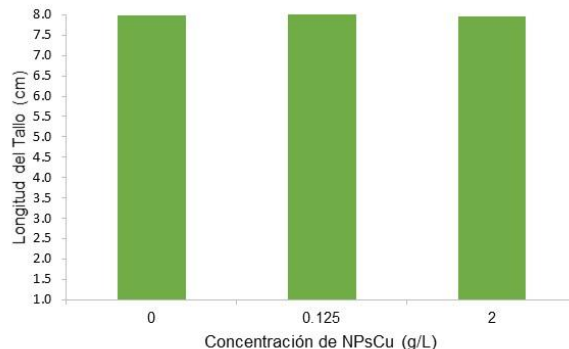


Figura 5. Relación entre la longitud del tallo de la plántula respecto a dos concentraciones de NPsCu n=87, *p≤ 0.05

CONCLUSION

La inhibición en la viabilidad celular de *Pestalotiopsis* spp. por las NPsCu es dependiente del tiempo y la concentración. Por otra parte, no existe un efecto fitotóxico en plántulas de *V. corymbosum*.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecemos a la Ing. Agrónomo Violeta Aspeitia Echegaray (Especialistas en papayas S. A. de C.V.) por la donación de las plántulas de arándano. A las estudiantes de Biología Experimental (DCNE-UG), Diana P. Morales Martínez y Jessica G. Conti González por su apoyo en la parte experimental.

REFERENCIAS

- [1] Liu J., Jin J., Deng Z. & Van Tendeloo G. (2012). Tailoring CuO nanostructures for enhanced photocatalytic property. *J. Colloid Interface Sci.* 384, 1-9.
- [2] Choi K.J., Jang H.W. (2010). One-dimensional oxide nanostructures as gas-sensing materials: review and issues. *Sensors* 10, pp. 4083-4099.

- [3] Rahman M.M., Ahammad A.J. & Lee, J. (2010). A comprehensive review of glucose biosensors based on nanostructured metal-oxides. *Sensors* 10,. 4855-4886.
- [4] Wang S.B., Hsiao C.H. & Huang B.R. (2011). A CuO nanowire infrared photodetector. *Sensors Actuators A Phys.* 171, 207-211.
- [5] Llorens A., Lloret E. & Fernandez A. (2012). Metallic-based micro and nanocomposites in food contact materials and active food packaging. *Trends Food Sci. Technol.* 24, 19-29.
- [6] Essa A. & Khallaf M. (2016) Antimicrobial potential of consolidation polymers loaded with biological copper nanoparticles *BMC Microbiology* 16, 144
- [7] Usman M.S., ElZowalaty M.E. & Ibrahim N.A. (2013) Synthesis, characterization, and antimicrobial properties of copper nanoparticles. *Int J Nanomedicine.* 8, 4467–4479.
- [8] Shende S., Avinash P & Rai M. (2015). Green synthesis of copper nanoparticles by *Citrus medica Linn.*
- (Idilimbu) juice and its antimicrobial activity. *World J Microbiol Biotechnol.* 31, 865–873
- [9] Valencia A.L., Torres R., Latorre B.A. (2011). First Report of *Pestalotiopsis clavispora* and *Pestalotiopsis spp.* Causing Postharvest Stem End Rot of Avocado in Chile. *Plant Disease*, 95, 492
- [10] Luan Y.S., Shang Z.T., Su Q. (2008). First Report of a *Pestalotiopsis sp.* Causing Leaf Spot of Blueberry in China. *Plant Disease*, 92, 171
- [11] Espinoza J.G., Briceño E.X. & Latorre BA. (2008). Canker and twig dieback of blueberry caused by *Pestalotiopsis spp.* and a *Truncatella sp.* in Chile. *Plant Disease*. 92, 1407–1414.
- [12] Chen Y., Zhang A.F. & Kyaw E. P. (2016) First Report of *Pestalotiopsis clavispora* Causing Twig Blight on Highbush Blueberry (*Vaccinium corymbosum*) in Anhui Province of China. *APS Journal*, 100, 859
- [13] Bogdanović U., Lazić V. & Dimitrijević S. (2014). Copper nanoparticles with high antimicrobial activity. *Materials Letters*, 128, 75–78.
- [14] de la Rosa G., García-Castañeda C. & Molina C. (2017). Physiological and biochemical response of plants to engineered NMs: Implications on future design. *Plant Physiology and Biochemistry* 110, 226-235
- [15] Kumar Tripathi D., Singh S. & Kumar Chauhan D. (2017). An overview on manufactured nanoparticles in plants: Uptake, translocation, accumulation and phytotoxicity. *Plant Physiology and Biochemistry* 110, 2-12