



ESTANDARIZACIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA LA DETECCIÓN MOLECULAR DE *Sclerotium cepivorum* EN SUELOS, BASADA EN LA AMPLIFICACIÓN DE SECUENCIAS ESPACIADORAS INTERNAS DE TRANSCRIPCIÓN (ITS).

Cortez-Pérez Alejandra¹, Guevara-González Ramón Gerardo¹. 1. Departamento de Biosistemas. Facultad de Ingeniería. Campus Amazcala. Universidad Autónoma de Querétaro. Cerro de las Campanas S/N Col. Las campanas Querétaro, Querétaro. C.P. 76010

Palabras clave: *Sclerotium cepivorum*, ITS, fitopatología, *Allium cepa*, *Allium sativum*.

Introducción. En México, los cultivos de ajo y cebolla se encuentran dentro de los primeros 10 más importantes, en términos de producción y exportación. Por ello cualquier factor que pueda afectar las cosechas debe ser detectado y canalizado a tiempo. La pudrición blanca, ocasionada por *Sclerotium cepivorum* berck., es la principal enfermedad que afecta al género *Allium* ocasionando incluso pérdidas totales. (1). Así pues un método de detección sencillo, rápido y sensible se vuelve una prioridad. Los métodos actuales se basan en hacer cultivos selectivos sin embargo la recuperación se ve limitada por: el método de elección, los contaminantes, los competidores que a menudo superan en crecimiento al patógeno diana, más de una especie comparten caracteres morfológicos, y por el sesgo que el analista utiliza (2). El clúster de genes de ADN ribosómico (ADNr) es un objetivo de amplificación para detectar microorganismos patógenos, utilizando PCR para la detección de ciertas secuencias. La presencia de secuencias variables como las regiones ITS (espaciadores internos de transcripción) entre las subunidades permite la discriminación de especies estrechamente relacionadas de un género determinado de hongos. (2). Se propuso un método de detección, basado en la amplificación de ITS.

Metodología. Los experimentos se dividieron en tres partes: 1) Cultivo del hongo y sus diferentes aislados para estandarización de ensayo de PCR, 2) Prueba del método en plantas infectadas y 3) prueba del método en suelos infestados. Se contó con 7 aislados del hongo: Tecubur, Roural, Natubac-5, Soil Gaund, Cabrio y Blindaje 5D y Cortazar; adicionalmente se evaluó la especificidad del método utilizando *Aspergillus niger*, *Penicillium*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus flavus* y *Trichoderma atroviride*. Las extracciones de ADN se realizaron con adaptaciones de la metodología descrita por Dellaporta (3) y Vazquez-Marrufo y col (4). Para las pruebas de detección se hicieron ensayos de PCR anidadas con dos pares de primers: UNIVFUNGI y SCEP reportados por Schoch y col. 2012 (5) y por Divya y col. 2012(6) respectivamente, bajo las siguientes condiciones 5 min iniciales a 95° 30 ciclos de 30' a 95°C, 30' a 55°C y 30' a 72°C con 1 min a 72°C al final.

Resultados.

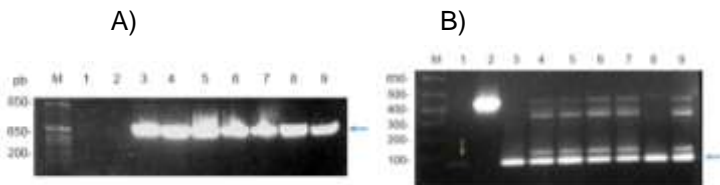


Fig. 1. Ensayo PCR Anidada. A) PCR I, usando primers UNIVFUNGI, carriles 1-2 control negativo, carril 3 aislado Cortazar, carril 4 aislado Tecubur, carril 5 aislado Blindaje, carril 6 aislado Cabrio, carril 7 aislado Natubac, carril 8 aislado Soil Gaund, carril 9 aislado Roural. B) PCR II usando los primers SCEP, carril 1 control negativo, carril 2 control positivo del ensayo de PCR I, carril 3 aislado Cortazar, carril 4 aislado Tecubur, carril 5 aislado Blindaje, carril 6 aislado Cabrio, carril 7 aislado Natubac, carril 8 aislado Soil Gaund, carril 9 aislado Roural; con la flecha azul se indica la banda que corresponde a la región ITS.

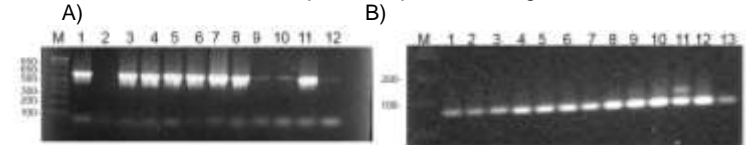


Fig 2. Ensayo de especificidad. A) Ensayo de PCR usando primers UNIVFUNGI, carril 1-2 *Trichoderma*, carril 3-4 *Penicillium*, carril 5-6 *Aspergillus niger*, carril 7-8 *Aspergillus oryzae*, carril 9-10 *Aspergillus flavus*, carril 11 control positivo (ADN de *S. cepivorum*), carril 12 control negativo. B) Ensayo de PCR usando como primers SCEP, carril 1-2 *Trichoderma*, carril 3-4 *Penicillium*, carril 5-6 *A. niger*, carril 7-8 *A. oryzae*, carril 9-10 *Aspergillus flavus*, carril 11 control positivo (ADN de *S. cepivorum*), carril 12-13 control negativo.

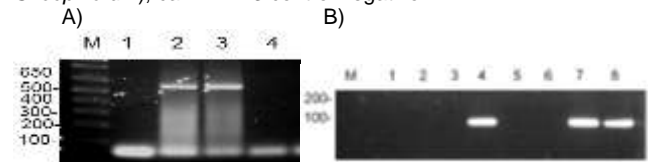


Fig 3. Identificación del hongo en suelo. A) Ensayo de PCR I usando primers UNIVFUNGI, carril 1 control negativo, carril 2-6 muestras provenientes de extracción de ADN de suelo, carril 7 control positivo. B) Ensayo de PCR II con los primers SCEP, carril 1 control negativo, carril 4 control positivo, los carriles 7 y 8 contenían como ADN molde 1 µl de los tubos 2 y 3 respectivamente del PCR I (imagen A).

Conclusiones. La detección molecular amplificando las regiones ITS del hongo fitopatológico *Sclerotium cepivorum* es una estrategia eficiente, específica y sencilla para identificar al hongo en muestras de plantas y suelo.

Agradecimiento. Al FORDECyT por el apoyo económico en la realización de este trabajo. Al CINVESTAV Irapuato y al Instituto de Ciencias Agrícolas de Guanajuato por la donación de las Cepas y variedades del hongo. A la Universidad Autónoma de Querétaro.

Bibliografía.

- Delgadillo F, Zavaleta E, Aguilar A, Arévalo A, Torres I, Valdivia R, Garzón R. (2004) Manejo de la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* berki) del ajo en Guanajuato, México. *Agricultura Técnica en México*; 30: 41-52.
- Papomatas, E.J. Molecular Diagnostics of Fungal Pathogens. (2006). *Arab J. Pl. Prot.*; 24: 147-158.
- Dellaporta S, Wood J, Hicks JBA, Plant DNA miniprep: Version II(1983).. *Plant Molecular Biology Reporter* 1:19-21
- Vázquez-Marrufo G, Vázquez-Garcidueñas MS, Gómez-Luna BE, Olalde-Portugal V. DNA Isolation From Forest Soil Suitable for PCR Assays of Fungal and Plant rRNA Genes. (2002) *Plant Molecular Biology Reporter*; 20: 379-390.
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., ... Schindler, D. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(16), 6241-6246
- Divya,D., Gopinath,L.R., Arjunan,S. and Gnanendra,S.(2012) Research and Development, Selvammm Computational Biology Research Center, Pappinaiickenpatty, Salem Main Road, Namakkal, Taminadu 637003, India.