



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



DISEÑO DE INICIADORES ESPECÍFICOS PARA LA DETECCIÓN POR PCR DE *Colletotrichum capsici*

Claudia Torres-Calzada¹; Raúl Tapia-Tussell¹; Inocencio Higuera-Ciapara¹ y Daisy Pérez-Brito.
Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. Calle 43 No. 130, Col. Chuburná de Hidalgo, C.P. 97200.
E-mail: ctorres@cicy.mx

Colletotrichum capsici – antracnosis – detección molecular

Introducción. *Colletotrichum capsici* es una especie patógena que genera grandes pérdidas alrededor del mundo, ocasionando una enfermedad conocida como antracnosis (1). Tradicionalmente, la identificación de la especie que produce la enfermedad se realiza con base en sus características morfológicas y fisiológicas, pero estos estudios pueden ser complicados y tardados y en ocasiones los resultados no son conclusivos. Una alternativa eficiente es el empleo de técnicas moleculares, como las basadas en la PCR y el uso de iniciadores especie-específicos (2).

En este contexto, el objetivo de este trabajo fue diseñar iniciadores de PCR específicos que permitieran la detección de *C. capsici* a partir de diferentes hospederos.

Metodología. Se obtuvieron del GenBank las secuencias de la región ITS del ADN ribosomal de 17 especies de *Colletotrichum*. Se realizó un alineamiento múltiple de secuencias (3) y se diseñaron iniciadores a partir de las divergencias entre las secuencias. La especificidad de los iniciadores fue confirmada mediante la amplificación con el ADN de 21 aislados de *C. capsici*, con otros aislados de *Colletotrichum* (*C. gloeosporioides*, *C. dematium*, *C. lindemuthianum* y *C. graminicola*) y con aislados de diferentes especies de hongos incluidos ascomicetos, basidiomicetos y deuteromicetos.

Resultados. Después del alineamiento de las secuencias de la región ITS de *Colletotrichum* spp. se diseñó un juego de iniciadores para la región de ADN ribosomal (Fig. 1). El análisis de especificidad *in silico* demostró que los iniciadores diseñados amplificaban solamente para la especie *C. capsici*.



Fig. 1. Comparación de secuencias de la región ITS de *C. capsici* (HM015005 y EU056740) y *C. gloeosporioides* (HM562710). La localización de los iniciadores está delimitada por los cuadros.

La especificidad de los iniciadores *in vitro* fue examinada usando ADN de los aislados colectados, así como con ADN de las cepas de referencia. Fue posible detectar una banda de 394 pb solamente para los aislados de *C. capsici* (Fig. 2). Se realizaron diluciones sucesivas de

una solución de ADN partiendo de 100 ng/μL hasta 10 fg/μL para determinar la sensibilidad del método el cual permitió la amplificación de hasta 10 pg de ADN (Fig. 3).

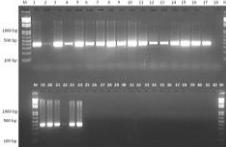


Fig. 2. Especificidad de los iniciadores diseñados. Línea 1, M.M.; líneas 1 y 19, *C. capsici* ATCC 48574; líneas 2-17 y 20-24, *C. capsici*; líneas 25-28, *C. gloeosporioides*; línea 29, *C. dematium* ATCC 200634; línea 30, *C. lindemuthianum* CBS 131.57; línea 31, *C. graminicola* CBS 113173; líneas 32-41, *C. cassicola*, *T. hirsuta*, *P. chrysosporium*, *C. lunatus*, *A. rolfsii*, *Bipolaris* sp., *Alternaria* sp., *R. solani*, *F. oxysporum*; líneas 18 y 42, C (-).

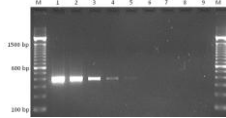


Fig. 3. Ensayo de sensibilidad para los iniciadores. Línea M, marcador molecular, líneas 1-8, productos amplificados usando ADN a concentraciones de 100 ng/μL, 10 ng/μL, 1 ng/μL, 100 pg/μL, 10 pg/μL, 1 pg/μL, 100 fg/μL, 10 fg/μL; línea 9, C (-).

Se realizó la detección del hongo directamente del tejido infectado de plantas de papaya y el patógeno fue detectado en los tres tejidos analizados (Fig. 4)

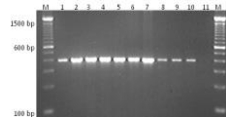


Fig. 4. Detección de *C. capsici* a partir de tejidos infectados. Línea 1, *C. capsici* ATCC 48574; líneas 2-4 frutos de papaya infectados; líneas 5-7, peciolo de papaya infectados; líneas 8-10, hojas de papaya infectadas; línea 11, fruto de papaya sano.

Conclusiones. Se obtuvo un juego de iniciadores específicos para *C. capsici* que logró discriminar a este patógeno de otras especies de hongos.

Agradecimiento. A CONACYT por la beca otorgada No. 32503. A la Fundación Quintana Roo PRODUCE por el financiamiento otorgado al proyecto con folio 23-2009-1712.

Bibliografía.

- Freeman S., Katan T. y Shabi E. (1996). *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1014-1020.
- Sreenivasaprasad S., Sharada K., Brown A.E. y Mills P.R. (1996). *Plant Pathol.* 45: 650-655.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. y Lipman D.J. (1990). *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.