



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

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

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

**ALEJANDRA CORTEZ PÉREZ**

DIRIGIDA POR

**Dr. RAMÓN GERARDO GUEVARA GONZÁLEZ**

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2014

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	vi
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Historia de la enfermedad	1
1.2 Sintomatología	2
1.3 Características de <i>Sclerotium cepivorum</i>	3
1.3.1 Esclerocios	4
1.4 Propagación	7
1.4.1 Consideraciones cuarentenarias	8
1.4.2 Manejo fitosanitario	8
1.5 Identificación de hongos en suelos	11
1.5.1 Técnica de tamizado húmedo empleado en el conteo de esclerocios de <i>Sclerotium cepivorum</i> en suelos.	12
1.5.2 Nuevas estrategias en la identificación de microorganismos	13
2. HIPOTESIS	15
3. OBJETIVOS	16
3.1 General	16
3.2 Específicos	16
4. METODOLOGÍA	17
4.1 Materiales	17
4.1.1 Material biológico	17
4.1.2 Medios de cultivo	17

4.2 Métodos	18
4.2.1 Propagación del hongo	18
4.2.2 Extracción de ADN	18
4.2.3 Ensayos de PCR	18
4.2.4 Determinación de la densidad del inóculo.	19
4.2.5 Ensayo de especificidad	19
4.2.6 Ensayos en plantas	20
4.3 Diseño Experimental	21
5. RESULTADOS	22
5.1 Crecimiento y propagación de aislados de <i>Sclerotium cepivorum</i>	22
5.2 Extracción de ADN de los aislados de <i>Sclerotium cepivorum</i>	23
5.3 Condiciones de PCR	23
5.4 Ensayo de PCR anidada para todos los aislados	24
5.5 Ensayo de especificidad	27
5.6 Ensayos en plantas	28
5.7 Identificación del hongo <i>S. cepivorum</i> en suelo	33
6. DISCUSIÓN	35
7. CONCLUSIONES	37
8. PERSPECTIVAS	38
9. REFERENCIAS	39
ANEXOS	43

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Oligonucleótidos usados en las reacciones de PCR	19
2	Grupos de plantas separadas por inóculo.	20

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Sintomatología típica de la pudrición blanca causada por el hongo <i>Sclerotium cepivorum</i>	3
2	Esclerocios generados por <i>Sclerotium cepivorum</i>	5
3	Clúster de genes ribosomales	14
4	Condiciones para los ensayos de PCR	19
5	Aislados de <i>Sclerotium cepivorum</i> en diferentes fases de crecimiento.	22
6	Extracción de ADN genómico de los aislados de <i>Sclerotium cepivorum</i>	23
7	Barrido para determinar el óptimo en la temperatura de alineamiento.	24
8	Ensayo de PCR anidada.	25
9	Fragmentos esperados en el ensayo de PCR II.	26
10	Secuencia obtenida resultante de la secuenciación del fragmento amplificado por los oligonucleótidos SCEP	27
11	Cultivo <i>Aspergillus niger</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Aspergillus flavus</i> y <i>Trichoderma atroviride</i> , para su posterior uso en el ensayo de especificidad	28
12	Ensayo de especificidad.	29

13	Plantas de ajo durante la siembra, la emergencia y 3 semanas post-siembra.	30
14	Sintomatología de las plantas infectadas con los diferentes aislados del hongo <i>Sclerotium cepivorum</i> a las 3 semanas y dos meses post-infección.	31
15	Sintomatología de los bulbos de las plantas infectadas con los diferentes aislados del hongo <i>Sclerotium cepivorum</i> .	32
16	Extracción de ADN genómico de plantas infectadas	33
17	Identificación del hongo en plantas infectadas	33
18	Identificación del hongo en suelo.	34

## RESUMEN

En México, los cultivos de ajo y cebolla se encuentran dentro de los 10 más importantes, tanto a nivel de producción nacional como de exportación. Por lo que cualquier factor que pueda ocasionar la pérdida de cosechas debe ser detectado y canalizado a tiempo. La pudrición blanca, ocasionada por *Sclerotium cepivorum*, es la principal enfermedad que afecta a las plantas del género *Allium* ocasionando incluso pérdidas totales en cultivos de importancia económica como el ajo y la cebolla; por lo tanto, el diseño de un método de detección sencillo, rápido y específico es fundamental en el control de la infección.

En este trabajo se desarrolló la estandarización de un método de detección, basado en la amplificación de ITS (Secuencias espaciadoras internas), estas secuencias que separan los genes ribosomales son usadas actualmente para diferenciar entre especies de hongos. En este trabajo se realizaron experimentos de extracción de ADN y amplificación de estas secuencias ITS en cultivos del hongo, suelos contaminados, y plantas infectadas, optimizando tanto las condiciones de extracción, como las de amplificación para cada caso. Se logró identificar molecularmente al hongo fitopatógeno *Sclerotium cepivorum* directamente de suelo, en plantas infectadas y del hongo cultivado tanto en medio líquido como sólido, obteniendo una amplificación específica de ITS para *S. cepivorum*.

## 1 ANTECEDENTES.

La pudrición blanca, causada por el hongo *Sclerotium cepivorum* Berk., es una de las enfermedades fúngicas más destructivas y extendidas que reduce los niveles de producción de las plantas del género *Allium* en México, llegando incluso a ocasionar pérdidas totales en los cultivos (Delgadillo y col., 2004). El género *Allium* está compuesto por más de 500 especies entre las que encontramos *A. ampeloprasum* (poro), *A. sativum* (ajo), *A. schoenoprasum* (cebollín) y *A. cepa* (cebolla) (García, 1998), destacando principalmente el ajo y la cebolla por sus niveles de producción en México. La cebolla representa la quinta hortaliza de mayor importancia productiva y económica, generando en 2011 cerca 1, 398,851 toneladas y colocándose también como el primer exportador de cebolla a Estados Unidos y Canadá exportando cerca del 25 % de la producción nacional. (SAGARPA, 2011). México está colocado entre los diez primeros productores de ajo a nivel mundial en donde los estados destacados por su producción de acuerdo al SIAP son: Zacatecas, Guanajuato, Baja California, Sonora, Puebla, Aguascalientes, Oaxaca, Querétaro, Nuevo León y Guerrero (SIAP, 2010). Sin embargo este hongo ha sido reportado en ajo solamente en los estados de Guanajuato, Puebla, Zacatecas, Aguascalientes y la zona del Bajío (Pérez-Moreno y col., 2004).

### 1.1 Historia de la enfermedad

Se han encontrado reportes de pudrición blanca causada por *S. cepivorum* en África, América Europa y Oceanía, donde ha ocasionado pérdidas considerables en cultivos de cebolla y ajo (Romero, 1993). La pudrición blanca se asoció en primera instancia con cebolla en el Reino Unido en 1841 y posteriormente con ajo en Italia en el año

1903. Luego de esos primeros informes, la enfermedad se registró en todo el mundo (Couch y Kohn, 2000).

## 1.2 Sintomatología

La enfermedad puede presentarse en las plantas sin importar el estado de desarrollo en que se encuentren e incrementa a medida que se desarrolla el sistema radical. La sintomatología se vuelve evidente con frecuencia a los 60 días post-siembra y varía de acuerdo al estadio de desarrollo de la planta y en tiempo en el que se mantengan las condiciones que favorecen el crecimiento del hongo en el suelo, siendo una de las condiciones primordiales la temperatura (Crowe, 1995; Pinto y col., 1998).

El primer síntoma se observa como un amarillamiento general de la planta y coincide con el período de bulbificación, continúa con muerte descendente de las hojas externas y retarda del crecimiento. A lo largo de varios días o semanas se va dando un deterioro gradual concluyendo con el colapso final de las hojas y una pudrición basal seca o semiacuosa. Al mismo tiempo, en hojas inferiores y en las raíces se presenta abundantemente micelio blanco, lanoso y superficial que produce rápidamente esclerocios negros y esféricos ya sea sobre la superficie o dentro de los tejidos enfermos. En este punto del desarrollo de la enfermedad las plantas afectadas pueden arrancarse fácilmente del suelo y presentan el aspecto que se muestra en la Figura 1 (Pinto y col., 1998).

Si se presenta una alta densidad de inóculo hay una muerte repentina del cultivo en grandes áreas del campo, mientras que si el inóculo es bajo pueden morir plantas en

grupos de 2 a 40, siendo las plantas ubicadas en el centro del cultivo las primeras en morir (Crowe, 1995). El problema radica principalmente en el campo.

Sin embargo, si los bulbos son infectados en las etapas finales de su desarrollo se origina una pudrición suave durante el periodo de almacenamiento, sobre todo si son almacenados en condiciones húmedas (Luna y col., 2003; Velásquez-Valle y col, 2004).



Figura 1. Sintomatología típica de la pudrición blanca causada por el hongo *Sclerotium cepivorum* en plantas de cebolla (*Allium cepa*).

### 1.3 Características de *Sclerotium cepivorum*

*Sclerotium cepivorum* es un hongo imperfecto perteneciente al orden *Mycelia Sterilia* (Galli y col., 1980), es decir, se clasifica como deuteromiceto, ya que no se conoce su ciclo de vida sexual ni si produce esporas funcionales. A pesar de que la mayoría de la literatura indica que no presenta una fase teleomórfica conocida, se ha descrito a *Stromatinia cepivorum* como el estado de ascospora (Weber, 1973). Su medio de reproducción se da a partir de la generación de una gran cantidad de esclerocios que fungen como propágulos e inóculo (Crowe, 1995). Se ha reportado

que en ocasiones produce conidios en esporodoquios, sin embargo son aparentemente estériles (Agrios, 1996).

Podemos definir a los esclerocios como masas compactas de hifas, que generalmente poseen una cubierta oscura y son capaces de sobrevivir bajo condiciones desfavorables (Agrios, 1996; Pérez-Moreno y col., 2008). *S. cepivorum* produce en su mayoría, esclerocios cuya forma esférica uniforme posee una cubierta negra y lisa, de composición que va de 2 a 5 células de grosor rodeando una masa compacta y gruesa de micelio. Por lo general presentan un tamaño de 0,3 a 0,6 mm de diámetro; aunque también se han reportado esclerocios de forma irregular y tamaños que varían desde los 5 hasta los 25 mm (Crowe y Hall, 1980; Crowe, 1995). Los esclerocios pueden formar esclerocios secundarios, dentro o adyacentes a los esclerocios originales, lo cual es una estrategia que puede influir enormemente en su sobrevivencia (Coley-Smith y col., 1990).

### 1.3.1 Esclerocios

Los esclerocios, como los que se muestran en la figura 2, representan el inóculo para el desarrollo de esta enfermedad, son capaces de permanecer viables de 10 hasta 20 años en las condiciones propias del campo y sin necesidad de que esté presente hospedero. De acuerdo a lo reportado el porcentaje de sobrevivencia se sitúa arriba del 92%, mientras que la viabilidad alcanza hasta un 96% de los 5 a 10 años bajo el suelo, si este período incrementa a 15 o 20 años, los porcentajes de viabilidad varían entre 72 y 96% según sea la profundidad en la que se encuentran (Coley-Smith y col., 1990). Por otra parte, un estudio que evalúa el efecto que los factores como la humedad, la temperatura del suelo y la profundidad de entierro tienen sobre la

sobrevivencia de los esclerocios, indica que los esclerocios de *S. cepivorum* presentan una mayor sensibilidad al calor que los esclerocios de *Sclerotinia minor*, ya que muestran que para matar el 50% (DL 50) de los esclerocios de *S. minor* son necesarias 624 horas a 35°C, y para obtener el valor de la DL 50 en esclerocios de *S. cepivorum* únicamente basta con 130 horas (Adams,1987;



Figura 2. Esclerocios generados por el hongo *Sclerotium cepivorum* aislado “cortazar”.

Los esclerocios de *S. cepivorum* presentan una latencia constitutiva de 1-3 meses (Coley-Smith y col., 1990), es decir, un periodo de propágulo “dormido”, donde el desarrollo del organismo se ve interrumpido y se mantiene ese estado garantizando la persistencia en el suelo de este organismo por un periodo de tiempo necesario para su ciclo de vida (Lucas, 1998). Una vez que este periodo de latencia constitutiva es superada, los propágulos o esclerocios pueden presentar una latencia exógena, es decir que se ve condicionada por el medio en el que se encuentren, en este caso

el suelo, por ejemplo factores como: la micostasis, luz, temperatura y aireación (Coley-Smith y Cooke, 1971).

Los esclerocios pueden germinar de forma eruptiva o miceliogénica lo cual comienza con la aparición de una protuberancia sobre la superficie del esclerocio, posteriormente la cubierta se rompe y uno o varios tapones densos y grandes de micelio son empujados extrínsecamente; las hifas crecen y se ramifican a partir de cada tapón, provocando anastomosis libre (Granados, 2005).

Este proceso únicamente se estimula por exudados producidos por las raíces de las especies pertenecientes al género *Allium*. Los exudados son sustancias de sulfóxidos de alquil y alquenil-cisteína, no volátiles, que se metabolizan por la microflora del suelo, esencialmente por bacterias de la rizósfera, lo cual ocasiona que se produzcan compuestos volátiles como: sulfuros de n-propilo y alil cisteína, los cuales activan a los esclerocios en su forma latente hasta aproximadamente una distancia de 10 cm de la raíz y 30 cm de profundidad. Algunos estudios reportan que basta con un tiempo de exposición solo de 15 min para estimular la germinación, mientras que al nivel óptimo de germinación se llega después de 24 h o más, éstos mismos autores revelan que con una concentración de 2.5% (v/v) de sulfuro de alilo se puede obtener un 100% de germinación y a medida que aumenta la concentración hasta 20% (v/v) disminuye la germinación hasta el 47% (Granados, 2005).

Una vez que se completa la germinación del esclerocio, el hongo penetra en las raíces de la planta por medio de un apresorio, posteriormente crece intra e intercelularmente por entre las células parenquimáticas, después el tejido cortical se disgrega y en seguida el tejido vascular es irrumpido y macerado. La maceración

viene acompañada de la producción secuencial de enzimas encargadas de degradar la pared celular, especialmente de poligacturonasas (PG) y pectin-transeliminadas (PTE). De igual modo, hay producción de ácido oxálico una fitotoxina que actúa de forma sinérgica con las PG, bajan el pH y quelan el  $\text{Ca}^{++}$  cerca del óptimo para la acción enzimática, lo que ocasiona la pudrición suave característica; no obstante, la información sobre la relación que existe entre las hifas y la distribución de enzimas extracelulares que degradan la pared celular no ha sido esclarecida (Granados, 2005).

#### 1.4 Propagación

El micelio puede propagarse de planta a planta por el contacto directo de las raíces sanas con las infectadas, si están a una distancia de 1 a 2 cm. Algunos esclerocios se forman en las raíces, sin embargo la mayoría son formados en la base del bulbo, aunque esto ocurre solo hasta que el hongo ha logrado invadir y desarrollarse en esta parte de la planta (Crowe, 1995). Uno de los medios más efectivos de mover esclerocios a grandes distancias, es trasladar “dientes” que se encuentran infectados de un sitio de cultivo a otro. Cuando los almácigos de cebolla se establecen en un suelo infestado, las plántulas que ahí son producidas pueden trasladar esclerocios o micelio del hongo patógeno y al ser trasplantadas contaminan nuevas tierras.

Otra manera de propagar el patógeno es con el agua de riego, que al deslizarse por los bulbos infectados contribuirá con el desprendimiento de los esclerocios y los acarreará hacia otras partes del cultivo o hacia otras parcelas. Los esclerocios

también se pueden diseminar mediante el suelo que se adhiere a equipo agrícola, herramientas o al calzado de los trabajadores (Velásquez-Valle y col., 2001).

#### 1.4.1 Consideraciones cuarentenarias

Los cultivos capaces de transportar *S. cepivorum* están cuarentenados por Canadá, Panamá, Turquía, Tailandia. Estados Unidos presenta una cuarentena interna para este hongo. En México esta plaga está incluida en la NOM-008-FITO-1995 "Por la que se establecen los requisitos y especificaciones fitosanitarios para la importación de frutas y hortalizas frescas", con el fin de prevenir la introducción, diseminación y establecimiento de plagas de importancia cuarentenaria al territorio nacional (SAGARPA, 2012).

Según la SAGARPA "Esta plaga no cumple con los criterios de plaga cuarentenaria establecidos en la NIMF No. 5, debido a que se ha reportado su presencia en nuestro país y no se encuentra bajo control oficial, por lo que se considera, de acuerdo a la NIMF. No. 8, una plaga presente: sólo en algunas áreas sembradas con cultivos hospedantes" (SAGARPA, 2012).

#### 1.4.2 Manejo fitosanitario

Es difícil controlar la diseminación e infestación del hongo debido a que sus abundantes esclerocios pueden permanecer latentes hasta por 20 años. Por lo que el manejo de esta enfermedad puede ser de tipo químico y de manejo de cultivo, aunque con frecuencia los resultados son poco satisfactorios. La densidad de la población de esclerocios en el suelo determina la ocurrencia de la enfermedad en los cultivos (Delgadillo y col., 2002), es por ello que el control se enfoca a erradicarlos antes de la siembra del hospedante, ya sea con la aplicación de fumigantes al suelo

o con aplicaciones de compuestos que estimulan su germinación. El combate contra esta enfermedad puede fracasar si después del tratamiento y antes de la siembra las poblaciones de esclerocios continúan siendo excesivas (Pérez-Moreno y col., 2004). Existen estrategias para combatir al hongo como el uso de fungicidas, la aplicación de aceites sintéticos de Allium, inundación de suelo, rotación de cultivos, solarización, adición de composta, acolchado, incorporación de residuos de crucíferas y aplicación de antagonistas, con las cuales se ha logrado reducir la severidad de la enfermedad. También, se sugiere que la remediación de suelos que se encuentran altamente infestados y el manejo sustentable de la enfermedad son posibles solamente a través de una combinación de estrategias, sin embargo esto puede llevar varios años (1 a 3 o más, dependiendo del grado de infestación), antes de que sea posible volver a sembrar cebolla o ajo en un campo que ha sido infestado (Ulacio-Osorio y col., 2006).

El combate químico contra esta enfermedad ha sido ineficiente, debido quizá a que algunos de los fungicidas utilizados son de baja estabilidad en el suelo, además de que el hongo ha originado cepas de resistencia a algunos de los productos que son más comúnmente usados (Pérez-Moreno y col., 2004), y al mismo tiempo implica un elevado costo económico y ecológico (Granados, 2004).

Algunos autores recomiendan las siguientes medidas como parte de un manejo integrado:

- Uso de semilla sana.
- Análisis de suelo para comprobar la presencia de esclerocios del hongo.

- Saneamiento del cultivo, es decir, vigilar el cultivo y en caso de encontrar plantas con síntomas y extraerlas junto con las plantas vecinas.
- Aislamiento de manchones o lunares.
- Suspender el paso de maquinaria y agua de riego por el lugar del que se extrajeron plantas infectadas y aplicar solarización a dichas áreas.
- Tratamiento químico de la semilla de ajo.
- Aspersiones al suelo y a la planta, utilizando el mismo fungicida usado para la semilla.
- Incluir en el patrón de rotación de cultivos infectados la siembra de crucíferas como el brócoli, y al finalizar el ciclo de cultivo, los residuos se incorporen al suelo, ya que cuando se descomponen, liberan algunas sustancias que promueven la germinación de los esclerocios que mueren al no encontrar cultivos susceptibles como el ajo o la cebolla.
- No sembrar ajo no cebolla en terrenos infestados en por lo menos 8 años (Velásquez-Valle y col., 2001).

Es importante resaltar que a pesar de que realizar un análisis de detección de esclerocios en suelo funge como una medida en el manejo fitosanitario de esta enfermedad, no existe una manera específica y estandarizada de llevar a cabo este estudio, ya que los laboratorios que realizan análisis microbiológicos del suelo, se basan en estudios con cultivos selectivos, y en algunos trabajos de investigación reportan el uso del tamizado húmedo, técnicas sobre las cuales discutiremos a continuación. (Velásquez-Valle y Medina, 2004)

### 1.5 Identificación de Hongos en suelo.

El suelo es un ambiente muy complejo que tiene dificultades en la identificación, aislamiento y cuantificación de microorganismos patógenos, cuya detección y recuento siempre ha sido difícil (Kowalchuk, 1999).

Existe la necesidad de identificar de manera rápida y precisa hongos patógenos, especialmente aquellos que no pueden ser cultivados en medios sintéticos. La investigación sobre diversos aspectos de las enfermedades infecciosas en plantas como la epidemiología, la dispersión y la dinámica de la población, tiene como objetivo final desarrollar estrategias para un control efectivo de las infecciones.

A través de los años, han existido varios enfoques clásicos utilizados para detectar e identificar hongos fitopatógenos, sobre todo por su impacto económico. Los medios selectivos se idearon para excluir un gran número de organismos contaminantes (principalmente saprófitos) y permitir el crecimiento de los hongos blanco, es decir, los hongos causantes de las enfermedades. Sin embargo, en la mayoría de los casos (especialmente para microorganismos transmitidos por el suelo) la recuperación microbiana está influida por factores como el método de elección, la presencia de competidores los cuales a menudo crecen mejor y más rápido que el patógeno problema, el hecho de que hay más de una especie con los mismos caracteres morfológicos, mientras que el sesgo que el investigador utiliza en este método es una pieza clave en el escrutinio final (Paplomata, 2006).

La tendencia de la globalización en la agricultura ha creado incluso mayores demandas en diversos aspectos de la protección de las plantas. Con la promoción del comercio internacional que prácticamente borró las fronteras geográficas entre

países, la legislación establece reglas más estrictas en cuanto a movimiento de plantas y material vegetal. Las inspecciones fitosanitarias exigen normas de cuarentena más estrictas para obtener un mayor control, no sólo entre países, sino también en el territorio de un país determinado. El uso de material de propagación sano, la prevención de la propagación de un patógeno a otro país, se encuentran entre los desafíos diarios con los que se enfrentan muchos productores. Además, las fronteras de la investigación se han ampliado profundamente para permitirnos establecer una metodología molecular que nos ayude en la identificación de hongos fitopatógenos en suelos contaminados (Bahnweg y col., 1998; Paplomata, 2006).

1.5.1 Técnica de tamizado húmedo empleado en el conteo de esclerocios de *Sclerotium cepivorum* en suelo.

El tamizado es un procedimiento físico, que se emplea con el objetivo de separar una muestra a analizar en los diferentes tamaños de partícula que la conforman. Utiliza como herramienta básica un tamiz que puede ser desde una malla hasta un proceso industrial más complejo. Este proceso puede realizarse en seco cuando se desea analizar un material en polvo, o puede ser húmedo cuando se adiciona agua o un fluido a la muestra.

Esta técnica se adaptó para estimar la cantidad de esclerocios presentes en una muestra de suelo a finales de los 70's (Adams, 1979). Sin embargo, como Velásquez-Valle y colaboradores afirman se podría realizar una estimación errónea en el número de esclerocios viables en campo, con lo que se subestimaría el potencial de inóculo del hongo para producir una epidemia de pudrición blanca (Velásquez-Valle y col, 2004). Por esta razón se han implementado adaptaciones al método de tamizado

húmedo, por ejemplo Vimard propuso realizar un proceso de centrifugación con gradiente de sacarosa a la fracción de suelo obtenida después del proceso de tamizado, y posteriormente incubar los esclerocios en PDA a 17°C por algunos días (Vimard y col., 1986). Ulacio-Osorio y colaboradores, propusieron para determinar la viabilidad de los esclerocios romperlos después del proceso de tamizado e incubarlos en PDA por varios días (Ulacio-Osorio y col., 2006).

#### 1.5.2 Nuevas Estrategias en la Identificación de Microorganismos

El clúster de genes de ADN ribosómico (ADNr) que podemos ver en la figura 3, es un objetivo utilizado más ampliamente para la detección de hongos patógenos, utilizando PCR para la detección de ciertas secuencias, debido a una serie de características útiles:

- Los ADNr tienen secuencias comunes que se encuentran en el núcleo y en mitocondrias de los eucariotes.
- El clúster nuclear de ADNr presenta repeticiones en tándem de varios cientos de copias en la célula, lo que permite una alta sensibilidad de detección.
- El gen de ADNr está constituido por tres subunidades: una grande (LSU) del 28S y una pequeña (SSU) de 18S que están separados por un área mucho menor un gen de 5.8S. Las tres subunidades están conectados entre sí con dos espaciadores transcritos internos (ITS1 e ITS2).

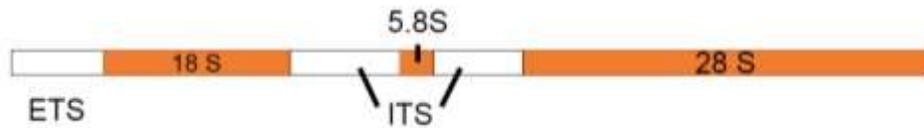


Figura 3. Clúster de genes ribosomales

Este grupo de genes completo se repite en el genoma muchas veces por lo tanto es un blanco atractivo para la amplificación PCR. Regiones muy conservadas situadas en la LSU hacen factible investigar las relaciones de géneros alejadas. Por otro lado, la presencia de secuencias variables como las regiones ITS entre las subunidades y la IGS (separadores intergénicos) entre los grupos de genes permite la discriminación de especies estrechamente relacionadas de un género determinado de hongos (Bridge y col, 1998).

Oligonucleótidos universales diseñados a partir de secuencias conservadas que se encuentran en la subunidad pequeña y grandes, se han utilizado ampliamente para la amplificación de sus regiones. Las secuencias amplificadas están entre 500-800 pb, un tamaño relativamente pequeño (White y col., 1990; Bruns y col., 1992; Gardesy Bruns, 1993). Por otra parte, la determinación de secuencias de ITS después de una amplificación por los oligonucleótidos universales, ha permitido la detección e identificación taxonómica de especies fúngicas desconocidas. Se ha reportado que incluso una diferencia de solo 5 nucleótidos en la región ITS fueron suficientes para diseñar oligonucleótidos específicos (Nazar y col., 1991; Paplomatas, 2006).

## **2. HIPOTESIS.**

Debido a la evidencia que existe sobre el potencial de las regiones ITS para ser usadas como blanco en la identificación de géneros de hongos estrechamente relacionados, proponemos que la amplificación por ensayos de PCR anidada de regiones ITS de *Sclerotium cepivorum* es una estrategia eficiente en la detección de este hongo fitopatógeno en muestras de plantas y suelo.

### 3. OBJETIVOS.

#### 3.1 General.

Estandarizar una metodología basada en técnicas moleculares (PCR) que nos permita detectar la presencia del hongo fitopatógeno *Sclerotium cepovirum* directamente de muestras de suelos infestados y de plantas infectadas con el hongo de forma rápida, específica y reproducible.

#### 3.2 Específicos.

- Evaluar el potencial de la secuencia “espaciador interno de transcripción 1, secuencia parcial; gen 5.8S de ARN ribosomal, secuencia completa; espaciador interno de transcripción 2, secuencia parcial” reportada con el código JX442200.1 en el NCBI (Centro Nacional de Información sobre Biotecnología) como blanco de amplificación para la identificación de *Sclerotium cepovirum*.
- Normalizar condiciones de extracción de ADN directamente de suelo.
- Estandarizar las condiciones del ensayo de amplificación
- Estimar la especificidad del método.
- Evaluar la detección del hongo en plantas infectadas.

## 4. METODOLOGÍA.

### 4.1 Materiales.

#### 4.1.1 Material Biológico.

Los microorganismos empleados en este estudio se dividen de la siguiente manera:

1) Cepa de referencia de *Sclerotium cepivorum*: Cepa “cortazar” proporcionada por el CINVESTAV unidad Irapuato.

2) Otros aislados de *S. cepivorum*: Cepas Tecubur, Roural, Natubac-5, Soil Gaund, Cabrio y Blindaje 5D, proporcionadas por el Instituto de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Guanajuato.

3) Otros hongos: para los ensayos de especificidad se utilizaron cepas de otros hongos como: *Aspergillus niger*, *Penicillium*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus flavus* proporcionados por el Doctor Sergio Romero Gómez, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro y *Trichoderma atroviride* proporcionado por el Doctor Ulises Esquivel, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro.

#### 4.1.2 Medios de Cultivo.

Se utilizaron dos medios de cultivo: Agar papa dextrosa ® Bioxon (PDA), caldo papa dextrosa ® Bioxon.

## 4.2 Métodos.

### 4.2.1 Propagación del Hongo.

Todos los aislados de *Sclerotium cepivorum* fueron crecidas en PDA y caldo PD, se incubaron a temperatura ambiente por aproximadamente 15 días. Los cultivos de agar se dejaron envejecer hasta la obtención de esclerocios.

### 4.2.2 Extracción de ADN.

Las extracciones de ADN se realizaron de acuerdo a la metodología descrita por Dellaporta para plantas, sustituyendo la pulverización con Nitrógeno líquido por una trituración de los esclerocios o micelio directamente en el tubo Eppendorf con ayuda de una varilla de vidrio puntiaguda (Dellaporta y col., 1983).

La extracción del suelo se realizará en base a los principios del método de extracción propuesto por Vazques-Marrufo y col., 2002 detallados en los anexos.

### 4.2.3 Ensayos de PCR.

Para los ensayos de PCR anidada se utilizó la enzima Titanium® Taq PCR Kits Clontech. En la PCR I se emplearon los oligonucleótidos UNIVFUNGI-R y UNIVFUNGI-F. En la PCR II se emplearon los oligonucleótidos SCEP-R y SCEP-F, y se usó como ADN molde el producto de la PCR I. Después de realizar barridos para determinar las mejores condiciones de temperatura se establecieron ciclos de: 95°-30', 55°-30', 72°-30', con 1 minuto de elongación final a 72° y 5 minutos de desnaturalización inicial para ambos ensayos descritos en la figura 4. Los ensayos se realizaron en 30 ciclos. Como control negativo se adicionó agua en sustitución del ADN molde. El producto de PCR fue corrido en un gel de agarosa al 1.2% y revelado en un fotodocumentador.

Cuadro 1. Oligonucleótidos usados en las reacciones de PCR

Nombre	Tipo	Secuencia	Referencia
UNIVFUNGI-F	Forward	5'-tcctccgcttattgatatgc-3'	Divya y col. 2012
UNIVFUNGI-R	Reverse	5'-ggaagtaaaagtcgtaacaagg-3'	Divya y col. 2012
SCEP-F	Forward	5'-tgttcgagcgctcattcaac-3'	Schoch y col. 2012
SCEP- R	Reverse	5'-gatccgaggcaccatagaaa-3'	Schoch y col. 2012

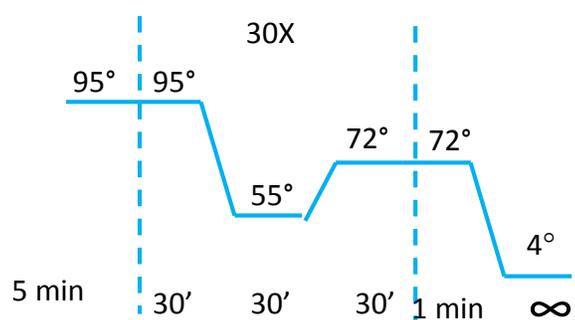


Figura 4. Condiciones para los ensayos de PCR

#### 4.2.4 Determinación de la densidad del inóculo.

La extracción de ADN del suelo se realizó adicionando a esta matriz de 20-50 g<sup>-1</sup> esclerocios tomados de los cultivos del hongo envejecidos. Los esclerocios fueron cosechados del cultivo con Tween 80 al 0.1 % colocados en un portaobjetos, se contaron y separaron para su adición al suelo.

#### 4.2.5 Ensayo de especificidad

En este ensayo se cultivaron *Aspergillus niger*, *Penicillium*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma atroviride* y *Aspergillus flavus* a 30°C, 37°C (para *A. flavus*), y 27°C (para *T. atroviride*). Posteriormente se extrajo de ADN con el mismo método descrito para *S. cepivorum*. El ADN extraído se cuantificó y se realizó un ensayo de PCR

anidada con las mismas condiciones previamente establecidas usando ADN de *S. cepivorum* como control positivo y agua como control negativo. Todos los ensayos se realizaron los ensayos por duplicado.

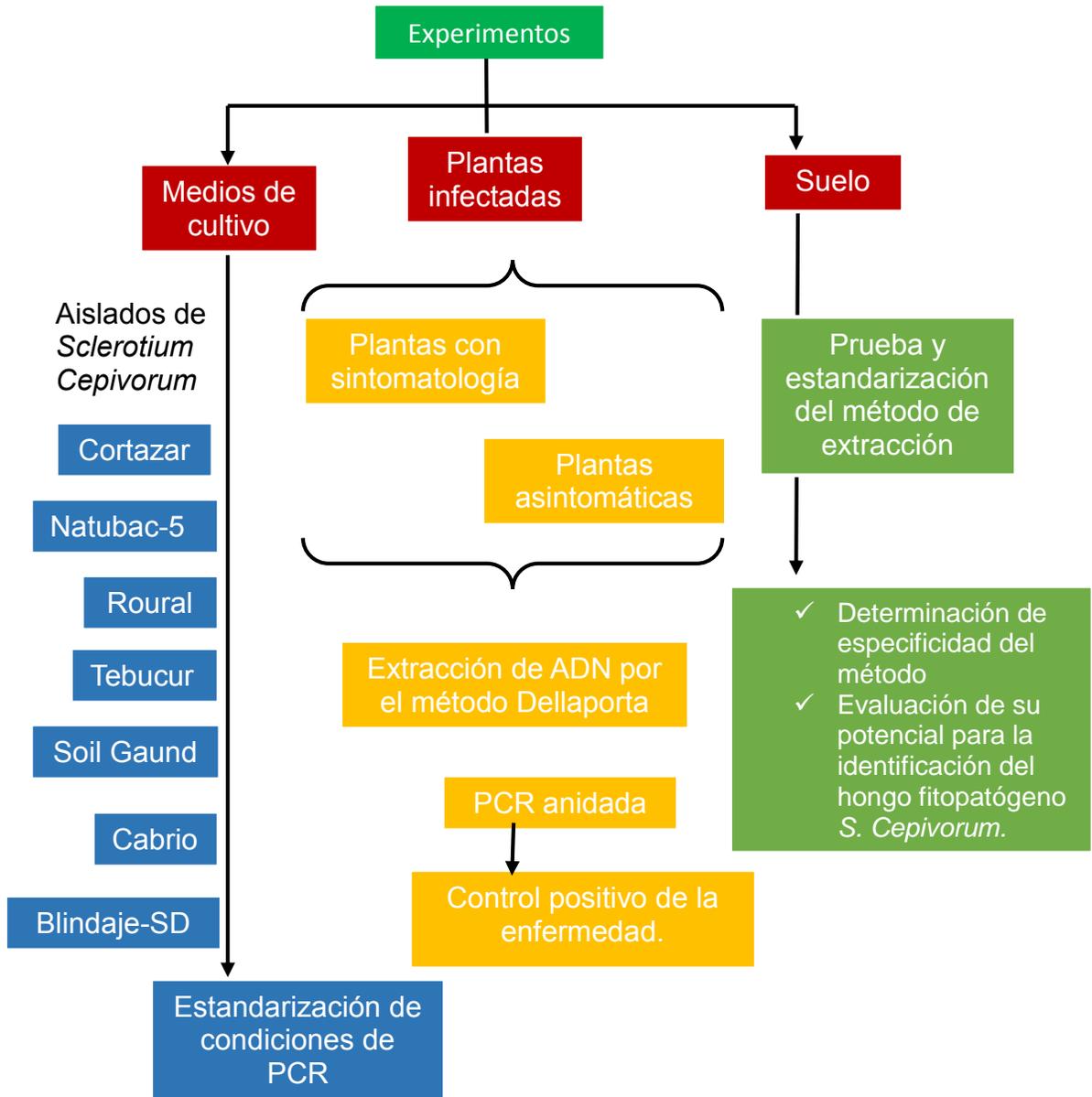
#### 4.2.6 Ensayos en plantas

Se cultivaron e infectaron con *S. cepivorum* plantas de ajo como control positivo en la detección de la enfermedad. Se compraron dientes de ajo común y se almacenaron a 4°C por 5 días. Fueron sembradas en ®PEAT MOSS como sustrato y se tuvo una emergencia del 92% en una semana. Se regaron semanalmente con solución nutritiva Steiner al 75% (para ver composición consultar Anexos). A las 3 semanas post-siembra se separaron las plantas en 8 grupos y se inocularon como se indica en el cuadro 2. A las 3 semanas post-infección cuando se vio la aparición de los primeros síntomas se realizó la primera extracción de ADN con sus posteriores ensayos de PCR. A los 2 meses post-infección se llevó a cabo las extracciones de ADN de las plantas restantes y ensayos de PCR para comprobar la identificación de *S. cepivorum* en plantas sintomáticas, asintomáticas y control (plantas sin inóculo). La extracción de ADN se realizó de bulbos y raíces por el método Dellaporta.

Cuadro 2. Grupos de plantas separadas por inóculo.

<b>Grupo</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>	<b>V</b>	<b>VI</b>	<b>VII</b>	<b>VIII</b>
<b>Inóculo</b>	Cortazar	Tecubur	Blindaje	Cabrio	Roural	Soil Gaund	Natubac	Control neg.
<b>No. De plantas</b>	4	4	4	3	3	3	3	2

### 4.3 Diseño Experimental.



## 5. RESULTADOS

### 5.1 Crecimiento y propagación de aislados de *Sclerotium cepivorum*.

En la figura 5 podemos observar algunos de los 7 aislados del hongo en distintas fases de su ciclo de vida, y creciendo tanto en medio líquido, como en agar.

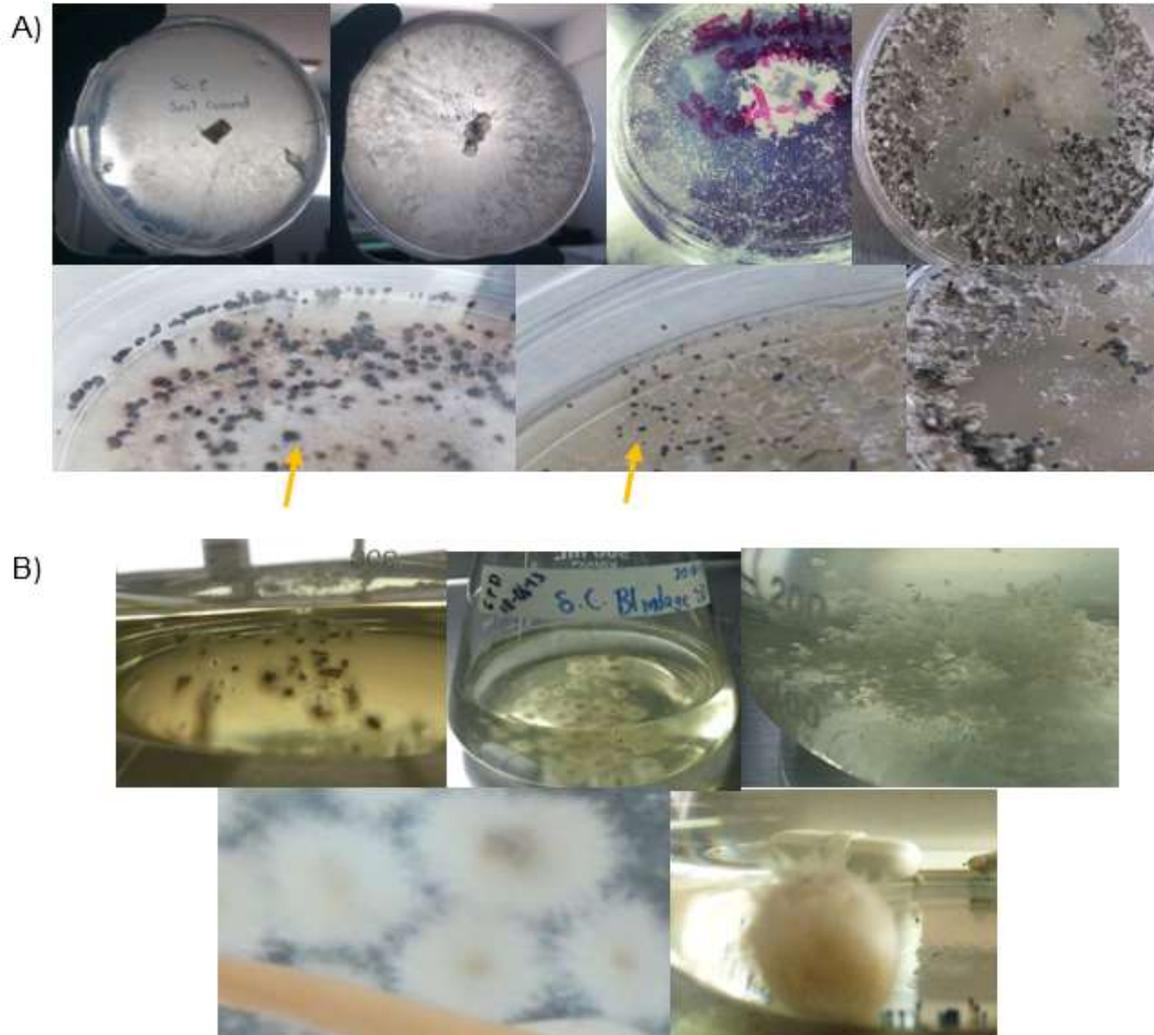


Figura 5. Aislados de *Sclerotium cepivorum* en diferentes fases de crecimiento. A) Cultivo de los diferentes aislados del hongo en medio PDA, desde su crecimiento ramificado hasta el envejecimiento del cultivo para la obtención de esclerocios. Señalados con flechas amarillas están indicados esclerocios de la variedad Blindaje del lado izquierdo y del lado derecho cortazar. B) Cultivo de los diferentes aislados del hongo en caldo papa dextrosa.

## 5.2 Extracción de ADN de los aislados de *Sclerotium cepivorum*

Este procedimiento se llevó a cabo de manera satisfactoria como se muestra en la figura 6, adaptando la metodología descrita por Dellaporta para plantas, con una variación en el primer paso, es decir se sustituyó la pulverización en presencia de Nitrógeno líquido por una trituración micelial o de los esclerocios, directamente en el tubo, lo cual evitó la pérdida de muestra y facilitó el proceso de rompimiento de la pared celular del hongo.

## 5.3 Condiciones de PCR.

Una vez realizada la extracción de ADN, se procedió a realizar un barrido para determinar la temperatura de alineamiento óptima ( $T_a$ ), se probaron las siguientes temperaturas: 65°C, 63.1°C, 59°C y 55°C. La temperatura óptima para ambos pares de oligonucleótidos fue 55°C como se muestra en la figura 7.

El ADN molde que se usó para este barrido provenía de cultivos en agar (ADN de caja, figura 7) y medio líquido (ADN de medio, figura 7).

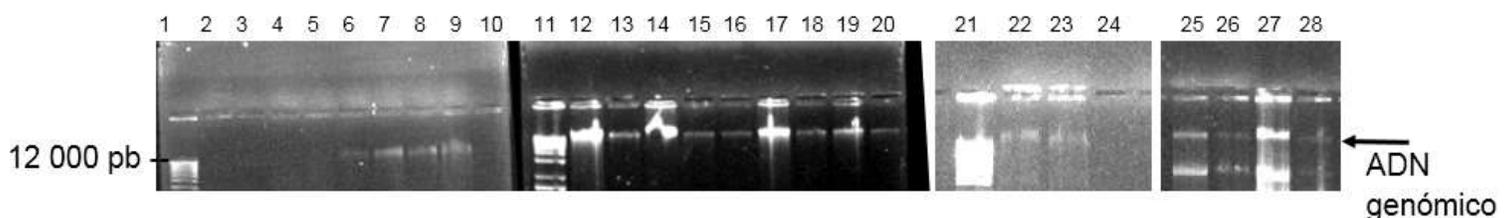


Figura 6. Extracción de ADN genómico de los aislados de *Sclerotium cepivorum*. Carriles 1, 11, 21 y 25 marcador de peso molecular; carriles 6 y 7 ADN genómico del aislado Roural, carriles 8 y 9 ADN genómico del aislado Soil Gaund, carriles del 12 al 20 ADN genómico del aislado Cortazar, carril 22 ADN genómico del aislado Natubac, carril 23 ADN genómico del aislado Cabrio, carriles 25 y 26 ADN genómico del aislado Tecubur y finalmente carriles 27 y 28 ADN genómico del aislado Blindage. La flecha indica la banda de ADN genómico, situada arriba de la primera banda que parece en el marcador molecular.

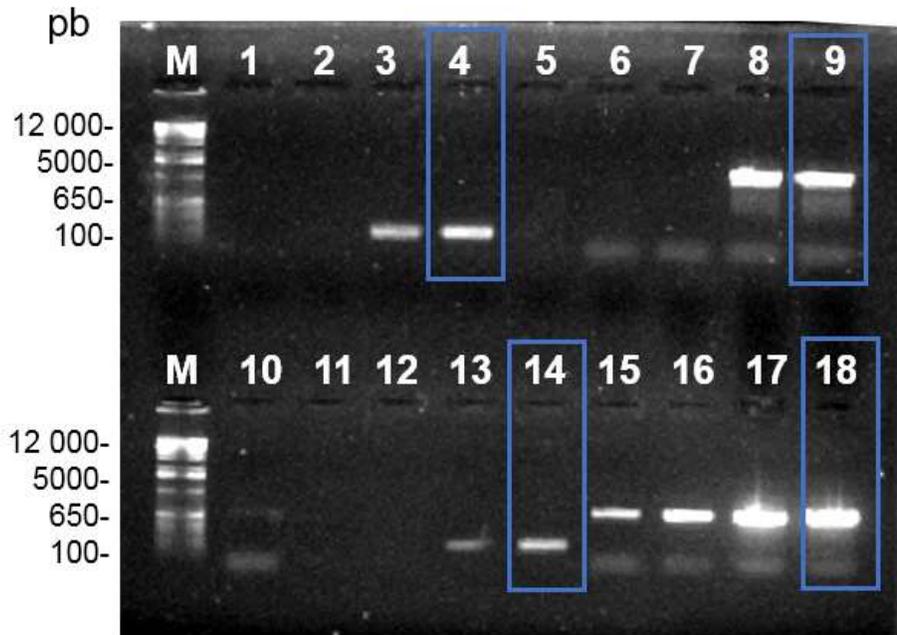


Figura 7. Barrido para determinar el óptimo en la Temperatura de alineamiento. Carril 1 oligonucleótidos SCEP Ta: 65 ° ADN de caja, carril 2 oligonucleótidos SCEP Ta: 63.1° ADN de caja, carril 3 oligonucleótidos SCEP Ta: 59° ADN de caja, carril 4 oligonucleótidos SCEP Ta:55° ADN de caja, carril 5 oligonucleótidos SCEP Ta:59° control negativo, carril 6 oligonucleótidos UNIVFUNGI Ta:65 ° ADN de caja, carril 7 oligonucleótidos UNIVFUNGI Ta:63.1° ADN de caja, carril 8 oligonucleótidos UNIVFUNGI Ta:59° ADN de caja, carril 9 UNIVFUNGI Ta:55° ADN de caja, carril 10 oligonucleótidos UNIVFUNGI Ta:59° control negativo, carril 11 oligonucleótidos SCEP Ta:65° ADN de medio, carril 12 oligonucleótidos SCEP Ta:63.1° ADN de medio, carril 13 oligonucleótidos SCEP Ta:59° ADN de medio, carril 14 oligonucleótidos SCEP Ta:55° ADN de medio, carril 15 oligonucleótidos UNIVFUNGI Ta:65 ° ADN de medio, carril 16 oligonucleótidos UNIVFUNGI Ta:63.1° ADN de medio, carril 17 oligonucleótidos UNIVFUNGI 59° ADN de medio, carril 18 oligonucleótidos UNIVFUNGI 55° ADN de medio.

#### 5.4 Ensayo de PCR anidada para todos los aislados.

Una vez que se optimizaron las condiciones de PCR, se realizaron ensayos de PCR anidada para todos los aislados del hongo *Sclerotium cepivorum*, en la imagen A de la figura 8 se observa el ensayo de PCR I con los oligonucleótidos universales para ITS de hongos (UNIVFUNGI) el cual nos muestra que se obtiene la misma banda

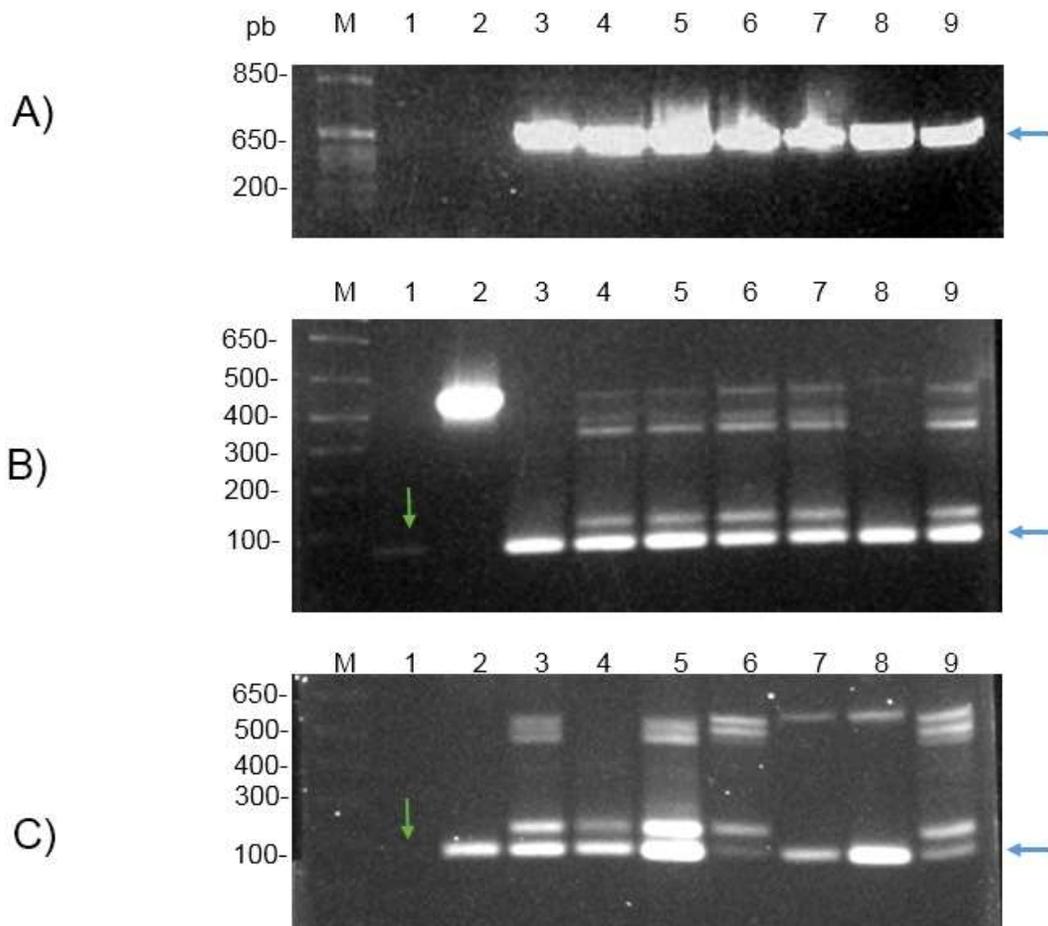


Figura 8. Ensayo de PCR Anidada. A) PCR I, usando oligonucleótidos UNIVFUNGI, carriles 1 y 2 control negativo, carril 3 aislado Cortazar, carril 4 aislado Tecubur, carril 5 aislado Blindaje, carril 6 aislado Cabrio, carril 7 aislado Natubac, carril 8 aislado Soil Gaund, carril 9 aislado Roural. B) PCR II usando los oligonucleótidos 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. C) Repetición del ensayo de PCR II con los oligonucleótidos SCEP, carril 1 control negativo, carril 2 aislado Cortazar, carril 3 aislado Tecubur, carril 4 aislado Blindaje, carril 5 aislado Cabrio, carril 6 aislado Natubac, carriles 7 y 8 aislado Soil Gaund, carril 9 aislado Roural.

para todos los aislados. Sin embargo, para el ensayo de PCR II se tuvieron más implicaciones que en el ensayo de PCR I, comenzando por el hecho de que tenemos 4 bandas, en algunos ensayos se visualizan más claramente que en otros, pero esto

se puede explicar debido a que es un ensayo cuyo ADN molde viene de otro PCR, por lo cual tenemos aún un poco de los oligonucleótidos anteriores y del producto de PCR anterior que no se utilizó en la reacción.

En la figura 9, vemos las bandas que suponemos se forman como producto en el PCR II, de los cuales el que nos interesa obtener, es el fragmento más pequeño, producto de la amplificación con los oligonucleótidos SCEP, el cual suponemos que sería el fragmento específico para amplificar ITS de *Sclerotium cepivorum*.

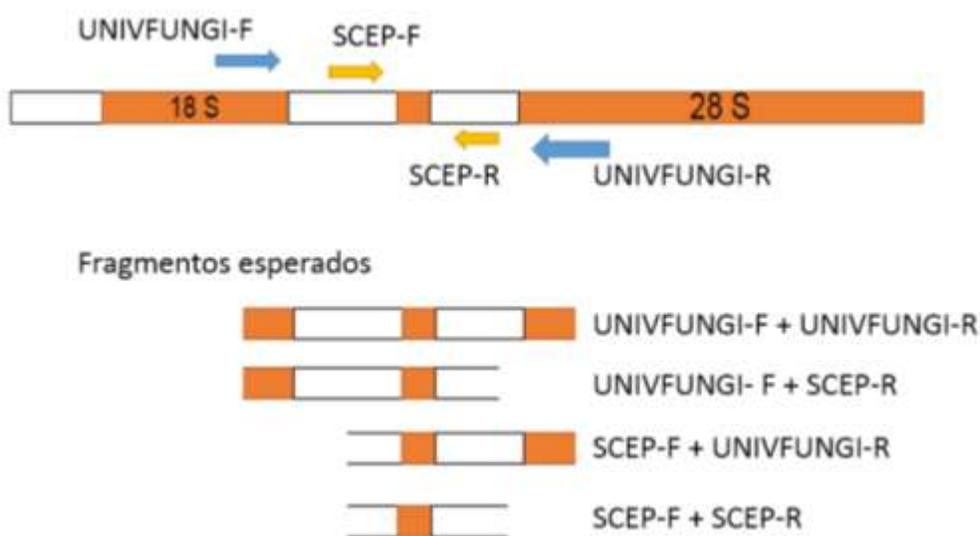


Figura 9. Fragmentos esperados en el ensayo de PCR II.

Después de la amplificación de la región ITS, se purificó este fragmento del aislado de cortazar, se secuenció, obteniendo como resultado la secuencia presentada en la figura 10; posteriormente se comparó esta secuencia con la reportada por el NCBI para ITS de *Sclerotium cepivorum* y se obtuvo una identidad del 99% con lo que se comprueba que el fragmento amplificado nos permite identificar molecularmente al hongo.

Secuencia:

CTCTGGTTTGGAGTCATGTCAGCAATGGCAGACTCTAAAATCAGTGGCGGGCGCCGTTGGGTCCTGAACGT  
AGTAATATCTCTCGTTACAGGTTCTCGATGTGCTTCTGTCAAACCTAAATTTTCTATGGTGCCTCGGATC

*Sclerotium cepivorum* strain 12 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence

Sequence ID: [gb|JX442200.1](#) Length: 470 Number of Matches: 1

[Related Information](#)

Range 1: 330 to 468 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
244 bits(132)	1e-61	137/139(99%)	2/139(1%)	Plus/Plus
Query 4	TGGT-TTGAGT-CATGTCAGCAATGGCAGACTCTAAAATCAGTGGCGGGCGCCGTTGGGTC	61		
Sbjct 330	TGGTATTGAGTCCATGTCAGCAATGGCAGACTCTAAAATCAGTGGCGGGCGCCGTTGGGTC	389		
Query 62	CTGAACGTAGTAATATCTCTCGTTACAGGTTCTCGATGTGCTTCTGTCAAACCTAAATT	121		
Sbjct 390	CTGAACGTAGTAATATCTCTCGTTACAGGTTCTCGATGTGCTTCTGTCAAACCTAAATT	449		
Query 122	TTCTATGGTGCCTCGGATC	140		
Sbjct 450	TTCTATGGTGCCTCGGATC	468		

Figura 10. Secuencia obtenida resultante de la secuenciación del fragmento amplificado por los oligonucleótidos SCEP. También se muestra su posterior alineamiento con en BLAST con la secuencia reportada por el NCBI.

### 5.5 Ensayo de Especificidad.

Para este ensayo se cultivó *Aspergillus niger*, *Penicillium*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus flavus* y *Trichoderma atroviride* mostradas en la figura 11. Después se extrajo ADN y se realizaron los ensayos de PCR. En la imagen A de la figura 12, vemos que el ensayo de PCR I con los oligonucleótidos UNVFUNGI es positivo para los géneros de hongos que se prueban, por lo que comprobamos la universalidad de éstos oligonucleótidos para amplificar regiones de ITS en hongos.

En la imagen B de la misma figura vemos el ensayo de PCR II con los oligonucleótidos de SCEP, el cual es positivo sólo para el carril que contiene ADN del hongo *Sclerotium cepivorum* indicado con una flecha azul, mostrando así que

este método puede ser usado para detectar solo al hongo *S. cepivorum* de manera específica.



Figura 11. Cultivo *Aspergillus niger*, *Penicillium*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus flavus* y *Trichoderma atroviride*, para su posterior uso en el ensayo de especificidad.

#### 5.6 Ensayos en plantas.

Los ensayos realizados en plantas se llevaron a cabo con el objetivo de comprobar que el hongo que estaba siendo detectado molecularmente era el responsable de la enfermedad fúngica reportada como pudrición blanca de plantas del género *Allium*, de tal manera que se cultivaron plantas de ajo mostradas en la figura 13 y posteriormente se infectaron con los 7 aislados del hongo, observando la sintomatología típica de la enfermedad en casi todas las plantas infectadas.

Por ejemplo en la imagen A de la figura 14 se muestran algunos de los síntomas reportados los cuales incluyen aparición de micelio blanco, amarillamiento general, pudrición del tallo, obstaculizar el crecimiento, y decaimiento de hojas, mientras que

estos síntomas no se observan en las plantas que no fueron inoculadas con el hongo, imagen B figura 14.

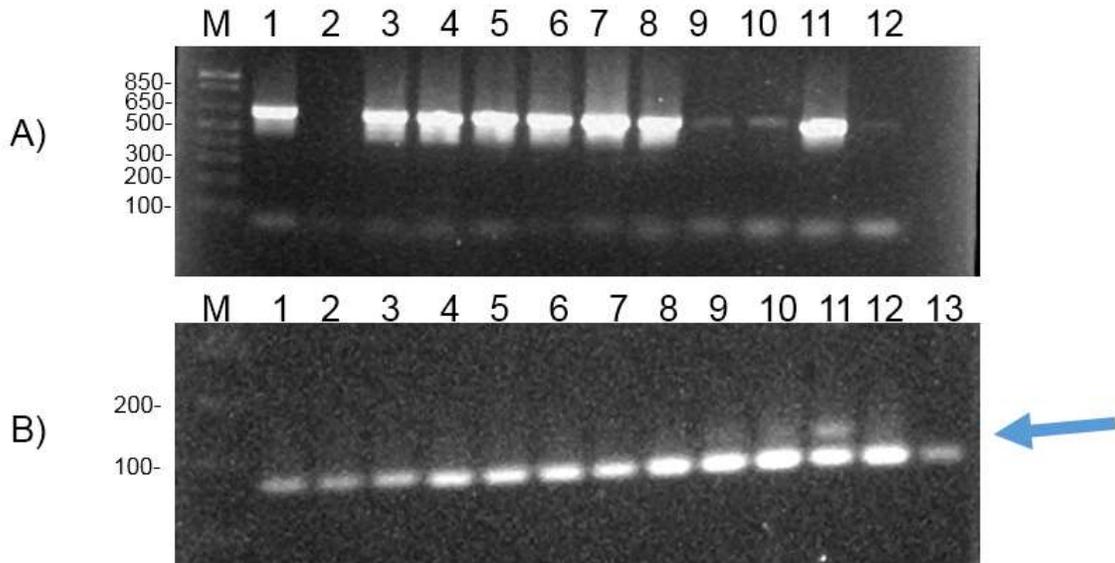


Figura 12. Ensayo de especificidad. A) Ensayo de PCR usando oligonucleótidos UNIVFUNGI, carril 1 y 2 *Trichoderma*, carril 3 y 4 *Penicillium*, carril 5 y 6 *Aspergillus niger*, carril 7 y 8 *Aspergillus oryzae*, carril 9 y 10 *Aspergillus flavus*, carril 11 control positivo (ADN de *S. cepivorum*),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

En la figura 15, imágenes A y B podemos observar el contraste entre los bulbos que fueron infectados por el hongo *S. cepivorum* en donde se visualiza la presencia de micelio blanco y estado de pudrición en general que se presenta en la enfermedad y los bulbos sanos que no fueron infectados.

Las extracciones de ADN se realizaron 3 semanas y dos meses post-infección, en la la figura 16, se indica con una flecha la banda correspondiente a ADN genómico; en

la imagen A de la figura 17 tenemos el ensayo de PCR I positivo solo para los carriles 8,11 y 14.

Esto debido a que como ADN molde tenemos no sólo ADN de *S. cepivorum*, si no también ADN de las plantas del ajo, y como ya se mencionó los oligonucleótidos UNIVFUNGI amplifican regiones de ITS sólo para hongos, por lo cual, los carriles positivos indican la presencia de ADN fúngico en las plantas infectadas, sin embargo es el ensayo de PCR II (imagen B, figura 17) el que nos confirma que las plantas infectadas tienen ADN de *Sclerotium cepivorum* y con este hecho se comprueba que el hongo detectado es el causante de la enfermedad de pudrición blanca en plantas del género *Allium*.



Figura 13. Plantas de ajo durante la siembra, la emergencia y 3 semanas post-siembra.



Figura 14. Sintomatología de las plantas infectadas con los diferentes aislados del hongo *Sclerotium cepivorum* a las 3 semanas y dos meses post-infección. A) Plantas infectadas. B) plantas sin inóculo.

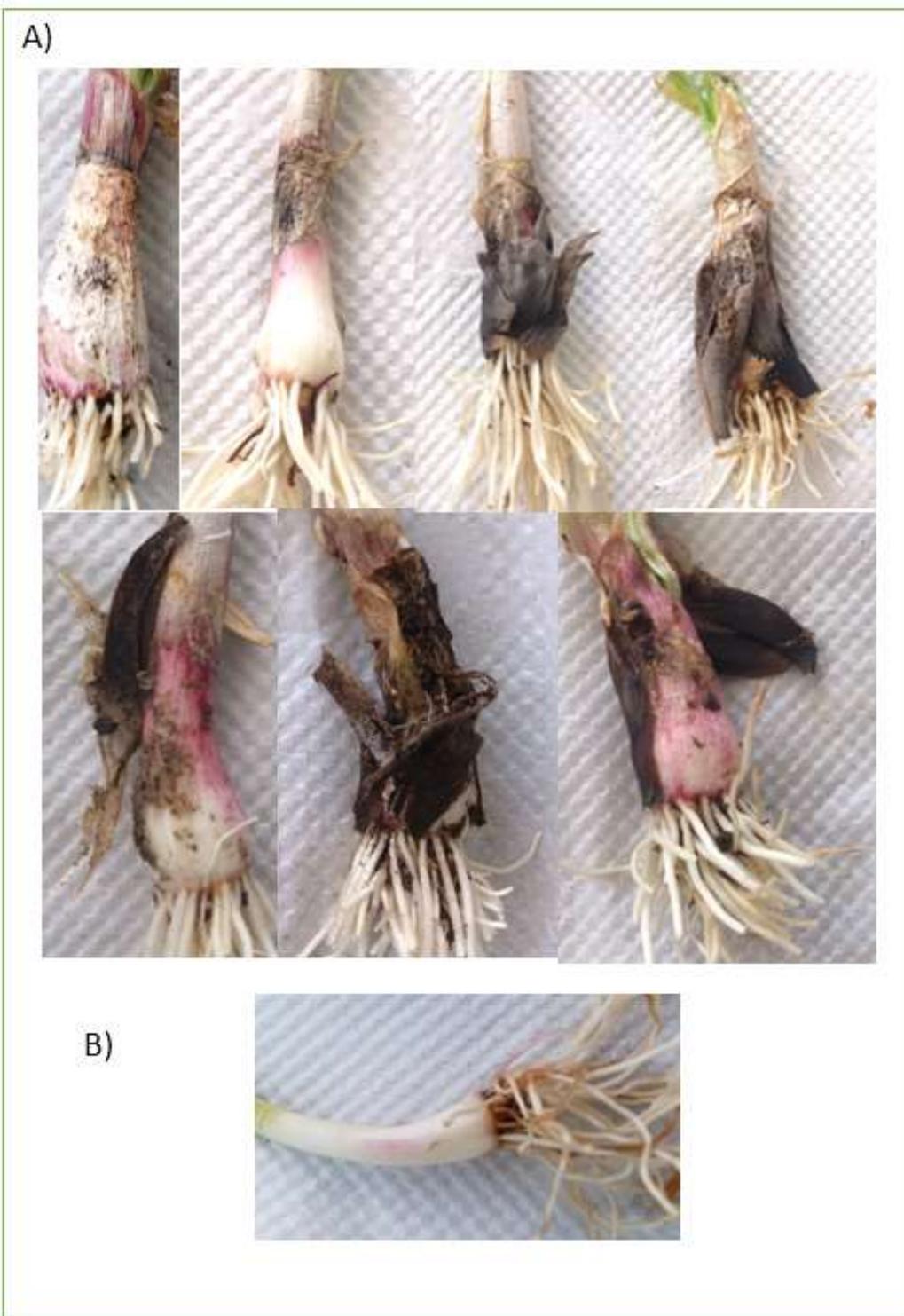


Figura 15. Sintomatología de los bulbos de las plantas infectadas con los diferentes aislados del hongo *Sclerotium cepivorum*. A) Plantas infectadas. B) plantas sin inóculo.

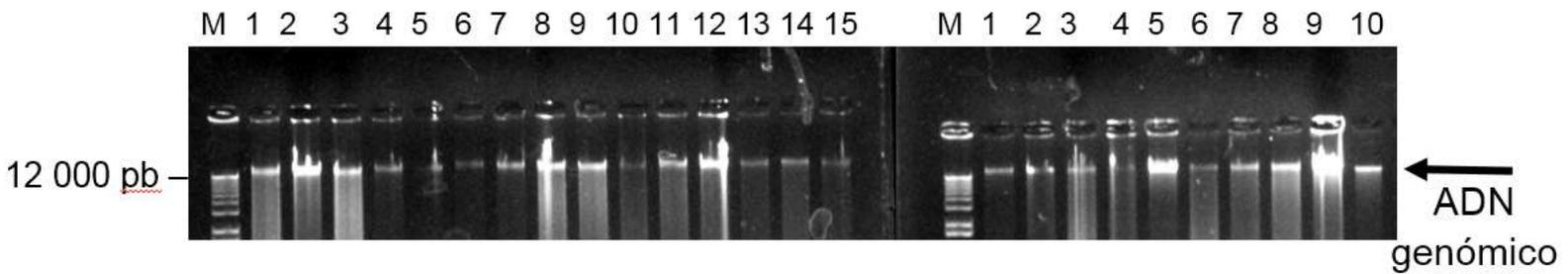


Figura 16. Extracción de ADN genómico de plantas infectadas. La flecha indica la banda que corresponde al ADN genómico, carriles del 1-15 y 1-10.

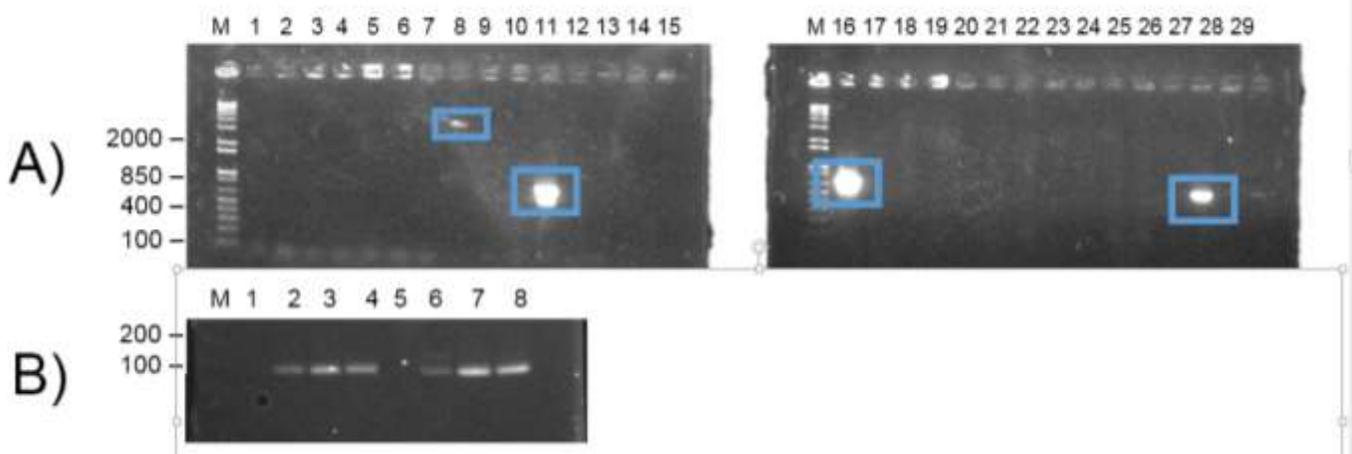


Figura 17. Identificación del hongo en plantas infectadas. A) Ensayo de PCR I usando oligonucleótidos UNIVFUNGI, carriles marcados con los cuadros azules, son positivos, carril 28 control positivo, carril 29 control negativo. B) Ensayo de PCR II con los oligonucleótidos SCEP, carril 1 control negativo, carril 2 control positivo, el carril 6 tenía como ADN molde 1  $\mu$ l del tubo 8 del PCR I (imagen A), el carril 7 tenía como ADN molde 1  $\mu$ l del tubo 11 del PCR I (imagen A), el carril 8 tenía como ADN molde 1  $\mu$ l del tubo 16 del PCR I (imagen A)

### 5.7 Identificación del hongo *S. cepivorum* en suelo.

Después de los ensayos realizados, se determinó que el punto crucial para que la detección del hongo en el suelo sea efectiva es el proceso de extracción de ADN, en el cual es necesario la adición de cloruro de bencilo, solvente orgánico que ayudara a eliminar los ácidos húmicos presentes en suelo que interfieren con la reacción de PCR (Vazques-Marrufo y col. 2002).

Otro punto importante es la resuspensión final de la muestra, ya que entre más diluida esté, será menos probable encontrar ADN del hongo o en su defecto hacer PCR de toda la muestra aumentaría considerablemente los costos. Es por ello que se recomienda realizar una resuspensión final de 10 – 5 µl por muestra.

En la figura 18 se comprueba que es posible detectar al hongo *Sclerotium cepivorum* directamente de una muestra de suelo. En este ensayo se tenía una densidad de inóculo de 40 esclerocios g<sup>-1</sup>.

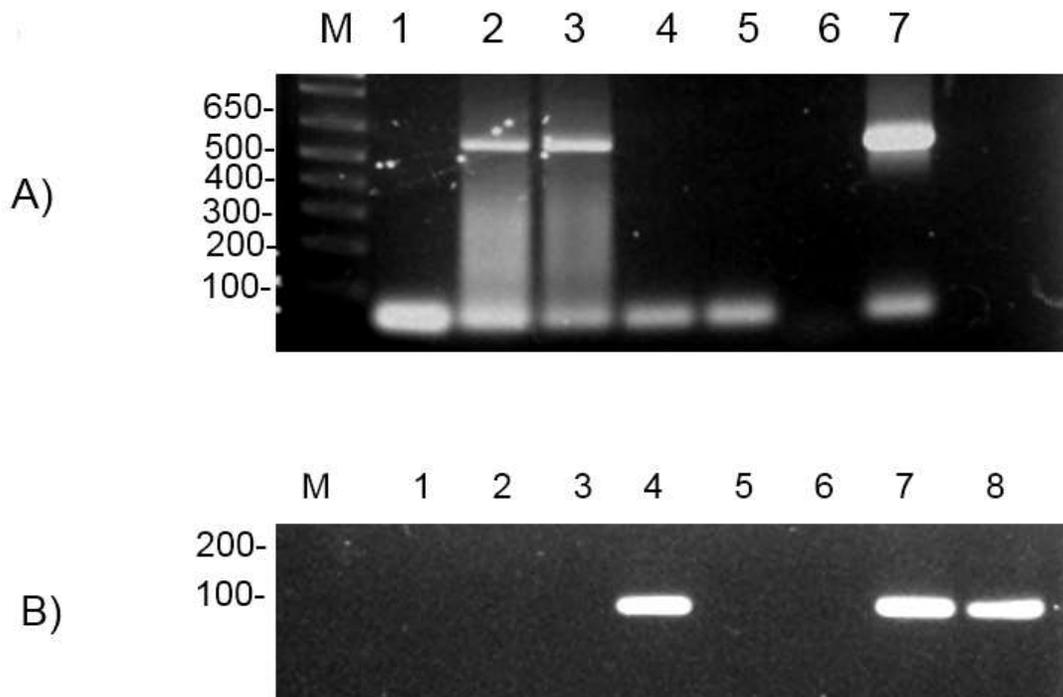


Figura 18. Identificación del hongo en suelo. A) Ensayo de PCR I usando oligonucleótidos UNIVFUNGI, carril 1 control negativo, carril 2-6 muestras provenientes de extracción de ADN de suelo, carril 7 control positivo. B) Ensayo de PCR II con los oligonucleótidos SCEP, carril 1 control negativo, carril 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).

## 6. DISCUSIÓN

Es importante resaltar las variaciones morfológicas que se presentan entre algunos de los aislados (figura 5), situación por la cual, dejar la identificación del hongo con base a características morfológicas puede llevar a una pérdida de objetividad ya que el resultado se limita al criterio del analista.

Otra variación resaltante es el tamaño de esclerocios que se formaron en los cultivos al dejarlos envejecer, los reportes indican (Crowe y Hall, 1980) que generalmente los esclerocios presentan un tamaño que va desde 0.3 a 0.6 mm, sin embargo en los cultivos se encontraron esclerocios con tamaños que van de 0.2 a 4 mm. El aislado de “cortazar”, es el que presentó una mayor homogeneidad en el tamaño de sus esclerocios con tamaños de 0.2 a 0.5 mm a diferencia de los otros aislados cuyos esclerocios van de 1 a 4 mm.

Esta información podría tener un impacto en la técnica de detección usada actualmente, el tamizado húmedo, ya que el tamaño esperado de los esclerocios determina el tamaño de malla a elegir en el proceso de separación, y una falla en el tamaño del tamiz, aumenta la posibilidad de estimar erróneamente la densidad de inóculo en un lugar infestado, y por lo tanto subestimar el potencial de la infección. Esto implica que en el método de detección utilizado actualmente debería considerarse cual variedad del hongo es que está causando la enfermedad, si esto no se toma en cuenta es posible que aumente la cantidad de inóculo estimado dando un falso positivo o se estén filtrando esclerocios en la malla del tamizado en lugar de ser retenidos, conduciéndonos a un falso negativo.

Un problema con el que nos enfrentamos fue la dimerización de los oligonucleótidos SCEP, cuyo principal inconveniente fue que el tamaño del producto de amplificación de SCEP y el tamaño de las amplificaciones formadas por los dímeros de oligonucleótidos es similar, lo cual se vio debido a que en el control negativo se visualiza también una banda, en algunos casos más ancha que otros.

En la imagen B de la figura 8, en el carril del control negativo señalada con una flecha podemos observar la banda de dimerización que no es tan densa como la banda obtenida al agregar ADN fúngico. Para contrarrestar el problema de dimerización se siguieron dos caminos, correr el producto de PCR en un gel de agarosa más concentrado (1.7%) o cambiar las condiciones de la mezcla de reacción de PCR. En la imagen B de la figura 12, se muestra el resultado de correr el producto de PCR en un gel más concentrado, donde se llega a obtener una separación entre la banda de los dímeros y la banda de amplificación de SCEP. En la imagen C de la figura 8 en carril del control negativo indicado con una flecha verde se observa el resultado de cambiar las condiciones de la mezcla de reacción, ya que se substituyó el buffer de la enzima Titanium® Taq por el buffer de la enzima Platinum® Taq, el cual tiene una mayor concentración de cloruro de magnesio entre otras sales. Por este motivo ya no se visualiza dimerización en este ensayo de PCR.

## **7. CONCLUSIÓN**

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

## **8. PERSPECTIVAS**

A partir del desarrollo de este proyecto se podría:

- Certificar el método de detección para implementarlo rutinariamente en terrenos de cultivo donde se pretenda sembrar plantas del género *Allium*, evitando las pérdidas de cultivos.
- Tener una prueba de detección que garantice especificidad, sensibilidad y rapidez.

## 9. REFERENCIAS

- Adams, P.B.** A rapid method for quantitative isolation of sclerotia of *Sclerotinia minor* and *Sclerotium cepivorum* from soil. **1979**. Plant Disease Reporter 63: 349-351.
- Adams PB.** Effects of soil temperature, moisture and depth on survival and activity of *Sclerotinia minor*, *Sclerotium cepivorum* and *Sporidesmium sclerotivorum*. Plant Disease Reporter. **1987**; 71: 170-174.
- Agrios GN.** Fitopatología. Trad. M Guzmán. 2ed. México DF: LIMUSA. **1996**; 513.
- Bahnweg G,** Schulze EM, Moller H, Rosenbrock C, Langebartels, Sandermann H. DNA isolation from recalcitrant materials such as tree roots, bark, and forest soil for the detection of fungal pathogens by polymerase chain reaction. Analytical Biochemistry **1998**; 262: 79-82.
- Bridge, P.D.,** Arora, D.K., Reddy, C.A., and Elander, R.P. **1998**. Applications or PCR in Mycology. CAB International. Oxon, UK. 357 p
- Bruns TD,** Vilgalys R, Barns SM, Gonzalez D, Hibbert DS, Lane DJ, Simon L, Stickel S, Szaro TM, Weisburg WG, Sogin ML. Evolutionary relationships within fungi: analysis of nuclear small subunit rRNA sequences. Molecular Phylogeny and Evolution **1992**; 1: 231-241.
- Coley-Smith JR,** Cooke RC. Survival and germination of fungal sclerotia. Rev. Phytopathol **1971**; 9: 65-92.
- Coley-Smith JR,** Mitchell CM, Sansford CE. Long-term survival of *sclerotia* of *Sclerotium cepivorum* and *Stromatinia gladioli*. Plant Pathology **1990**; 39:58-69.
- Couch BC,** Kohn LM. Clonal spread of *Sclerotium cepivorum* in onion production with evidence of past recombination events. Phytopathology **2000** 90:514-521.
- Crowe FJ,** Hall DH. Soil temperature and moisture effects on *sclerotia* germination and infection of onion seedlings by *Sclerotium cepivorum*. Phytopathology **1980**; 70:74-78.
- Crowe FJ,** Compendium of Onion and Garlic Diseases. APS press, **1995**; 14–16.
- Dellaporta S,** Wood J, Hicks JBA, Plant DNA minipreparation: Version II. Plant Molecular Biology Reporter **1983**; 1:19-21.

**Delgadillo** F, Zavaleta E, Aguilar A, Arévalo A, Torres I, Valdivia R, Garzón R. Manejo de la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* berk) del ajo en Guanajuato, México. Agricultura Técnica en México **2004**; 30: 41-52.

**Galli** F, Torres de Carvalho PC., Tokeshi H, Balmer E, Kimati H, Nogueira CO, Lima-Salgado C, Krugner T, Nogueira E, Filho AB. Manual de fitopatología: doenças das plantas cultivadas. São Paulo: Editora Agronômica Ceres. **1980**. vol.2:57-58.

**García** CR. El ajo: cultivo y aprovechamiento. 2a Edición. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, **1998**:37.

**Gardes** M, Bruns TD. ITS primers with enhanced specificity for *basidiomycetes* application to the identification of *mycorrhizae* and rusts. Molecular Ecology **1993**; 2:113-118.

**Granados** MM. Aislamiento, identificación y evaluación del efecto antagonista de hongos asociados a esclerocios de *Sclerotium cepivorum* Berk. causante de la pudrición blanca de la cebolla, en la zona alta de Cartago, Costa Rica. Tesis de Maestría en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales. **2004**; 100-106.

**Granados** MM. Pudrición Blanca de la cebolla: Una enfermedad difícil de Combatir. Agronomía Costarricense. **2005**; 29: 143-156.

**Kowalchuk** GA. New perspectives towards analysing fungal communities in terrestrial environments. Current Opinion in Biotechnology, **1999**; 10: 247-251.

**Lucas** JA. Plant pathology and plant pathogens. 3° edición Berlin: Blackwell Science Ltd. **1998**; 49.

**Luna** F, Flores A, Ponce P. Caracterización molecular de aislados de *sclerotium cepivorum* mediante análisis del polimorfismo de los fragmentos amplificados al azar. Elementos. **2003**; 49: 53 – 59.

**Nazar** R, Hu X, Schmidt J, Culham D, Robb J. Potential use of PCR-amplified ribosomal intergenic sequences in the detection and differentiation of *Verticillium* witi pathogens. Physiological and Molecular Plant Pathology **1991**; 39: 1-11.

**Paplomatas**, E.J. Molecular Diagnostics of Fungal Pathogens. Arab J. Pl. Prot. **2006**; 24: 147-158.

- Pérez-Moreno**, L., Rodríguez-Aguilera, A. y Sánchez-Pale, J. R. Efecto de *Coniothyrium minitans* Campbell en esclerocios de *Sclerotium cepivorum* Berk. Revista Mexicana de Fitopatología, **2004**; 22: 429-434.
- Pinto** CM, Maffia F, Berger LA, Mizubuti RD, Casali ESG. Progress of white rot on garlic cultivars planted at different times. Plant Disease Reporter **1998**; 82: 1142-1146.
- Romero** CS. Hongos fitopatógenos. México, Universidad Autónoma de Chapingo. **1993**; 342
- Samaniego** JA. Germinación y sobrevivencia de esclerocios de *Phymatotrichopsis* omnívora en respuesta a NaOCl y suelo con glucosa. Agricultura Técnica en México. **2008**; 34: 375-385.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.** SAGARPA. Anuarios estadísticos de la producción agrícola. México, **2011**.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera.** SIAP. México, **2008**.
- Ulacio-Osorio**, D. Zavaleta-Mejía, E. Martínez-Garza, A. Pedroza-Sandoval, A. Strategies for management of *Sclerotium cepivorum* Berk. in garlic. J. Plant pathology and plant pathogens. **2006**; 88:253-261.
- 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. Plant Molecular Biology Reporter **2002**;20: 379-390.
- Velásquez-Valle**, R., Medina A., M.M. Luna-Ruiz, J.J. Sintomatología y géneros de patógenos asociados con las pudriciones de la raíz del chile (*Capsicum annuum*) en el Norte-Centro de México. Revista Mexicana de Fitopatología. **2001**; 19:175-181
- Velásquez-Valle** R, Medina M. Persistencia de esclerocios de *Sclerotium cepivorum* berk. En suelos infestados de Aguascalientes y Zacatecas, México. Revista Mexicana de Fitopatología **2004**; 22: 143-146.
- Vimard** B. Legget ME. Rahe JE. Rapid isolation of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* from muck soil by sucrose centrifugation. Phytopathology. 1986; 76:465-467.
- Weber** GF. Bacterial and fungal diseases of plants in the tropics. Gainesville: University of Florida Press. **1973**; 369.

**White** TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Academic Press Inc **1990**; 315-322.

## ANEXOS

### Anexo 1. Método Dellaporta

- 1) Pulverizar la muestra en presencia de nitrógeno líquido.
- 2) Adicionar 500 µl del regulador Dellaporta.
- 3) Homogenizar mediante vortex.
- 4) Adicionar 50 µl de SDS 10X y resuspender por inversión.
- 5) Incubar a 65° C por 20 minutos
- 6) Agregar 150 µl de acetato de potasio 5M; dejar reposando en hielo 20 minutos.
- 7) Centrifugar a 12000 rpm / 10 min.
- 8) Colocar el sobrenadante en un tubo nuevo y agregar un volumen de isopropanol, dejar reposar en hielo 10 minutos.
- 9) Centrifugar a 12 000 rpm /5 minutos.
- 10) Eliminar el sobrenadante y resuspender en 100 µl de agua estéril.

### Anexo 2. Método de extracción propuesto por Vazques-Marrufo y col. 2002

- 1) Pesar de 3 a 5 gramos de suelo y pulverizar en presencia de Nitrógeno líquido.
- 2) Transferir a un tubo de 50 ml y agregar 10 ml de buffer de lisis, dar vortex 1 minuto.
- 3) Incubar a 65° por 15 minutos con agitación.
- 4) Agregar 10 ml de cloruro de bencilo y homogeneizar utilizando un agitador tipo vortex por 10 minutos. Incubar 65° por 15 minutos con agitación.

- 5) Agregar 10 ml de cloroformo y homogeneizar utilizando un agitador tipo vortex 1 minuto. Incubar en hielo por 10 minutos.
- 6) Centrifugar a 8500 g por 15 minutos y recuperar la fracción acuosa, mezclar con un volumen de isopropanol.
- 7) Incubar a -20 por 15 minutos y centrifugar 8500 g por 15 minutos.
- 8) Descartar la fracción acuosa, lavar el pellet con etanol al 70 %, secar al aire libre y disolver en 20-50 µl de agua desionizada.

Anexo 3. Solución Steiner al 75% composición para 20 litros.

<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad (gr)</b>
Nitrato de Calcio	10.13
Sulfato de Magnesio	7.42
Nitrato de Potasio	5.35
Fosfato Monopotásico	4.61
EDTA	0.73
Sulfato de Manganeso	0.0909
Ácido bórico	0.06
Sulfato de cobre	0.0039