

**Identificación del agente causal de la pudrición carbonosa en frutos de calabaza pipiana (*Cucurbita argyrosperma* Huber)**

AYVAR-SERNA, Sergio\*†, DÍAZ-NÁJERA, José Francisco, VARGAS-HERNÁNDEZ, Mateo y ALVARADO-GÓMEZ, Omar Guadalupe

*\*Centro de Estudios Profesionales. Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero. Avenida Vicente Guerrero Núm. 81. Iguala, Guerrero, C.P. 40000.**†Universidad Autónoma Chapingo, Dpto. de Fitotecnia, Km. 38.5 Carretera México-Texcoco, Chapingo, Estado de México C.P. 56230.**Universidad Autónoma Chapingo, Dpto. de Suelos, Km. 38.5 Carretera México-Texcoco, Chapingo, Estado de México C.P. 56230-4Facultad de Agronomía, UANL. Francisco Villa s/n C.P. 66050. Colonia Exhacienda "El Canadá", Escobedo, N.L.-*

Recibido Junio 4, 2014; Aceptado Octubre 13, 2014

**Resumen**

En Guerrero, a *Cucurbita argyrosperma* Huber, se le conoce como calabaza pipiana, es originaria de América y cultivada desde América Central hasta el sur de Estados Unidos. El 90% de la superficie sembrada en el estado es de temporal y sus frutos se consumen inmaduros a inicio del ciclo y maduros al finalizar el mismo. Pero sus semillas son las más valiosas, alcanzando precios muy atractivos en el mercado, además de que son el ingrediente principal de diferentes productos derivados de la industrialización de las mismas; como dulces típicos: jamoncillos palanquetas, y el tradicional platillo como el mole verde o mole pipián (Ayvar et al., 2007).

**Abstract**

In Guerrero, *Cucurbita argyrosperma* Huber, is known as pipiana pumpkin is native to America and cultivated from Central America to the southern United States. 90% of the acreage in the state is temporary and its fruits are eaten immature and mature cycle start to finish it. But their seeds are the most valuable, reaching very attractive prices on the market, plus they are the main ingredient of different products of industrialization thereof; as sweets: jamoncillos crowbars, and traditional dish like green mole or mole pipián (Ayvar et al., 2007).

**ID, agent, rot.****Identificación, agente, pudrición.**

**Citación:** AYVAR-SERNA, Sergio, DÍAZ-NÁJERA, José Francisco, VARGAS-HERNÁNDEZ, Mateo y ALVARADO-GÓMEZ, Omar Guadalupe. Identificación del agente causal de la pudrición carbonosa en frutos de calabaza pipiana (*Cucurbita argyrosperma* Huber). Foro de Estudios sobre Guerrero. Mayo 2013 Abril 2014, 1-1: 28-32

\* Correspondencia al Autor (Correo Electrónico: ayvarsernas@hotmail.com)

† Investigador contribuyendo como primer autor.

**Introducción**

En los últimos años, la demanda y el precio de la semilla se ha incrementado convirtiéndose en un cultivo atractivo para los productores, quienes han aumentado la superficie sembrada, generando expectativas de mejorar los niveles de producción, por medio de alternativas de industrialización de la semilla., En algunas zonas, la calabaza pipiana se cultiva en suelos planos, pesados y mal drenados, así, durante el verano las condiciones cálidas y con alta humedad relativa en combinación con el hábito de crecimiento rastroso e indeterminado del cultivo se genera un microclima con condiciones adecuadas para el desarrollo e infección de enfermedades. Los factores limitantes de la producción son la alta incidencia de enfermedades de origen fungoso, principalmente hongos fitopatógenos habitantes del suelo, limitando la producción y ocasionando disminución en el rendimiento, afectando los ingresos económicos de los productores (Ayvar et al., 2007). En la región generalmente, en el cultivo de calabaza pipiana los productores no utilizan ningún fungicida para el control de estos patógenos y el problema tiende a ser más grave cuando los productores no practican la rotación de cultivos incrementándose el índice de pudrición en los frutos.

**Objetivo**

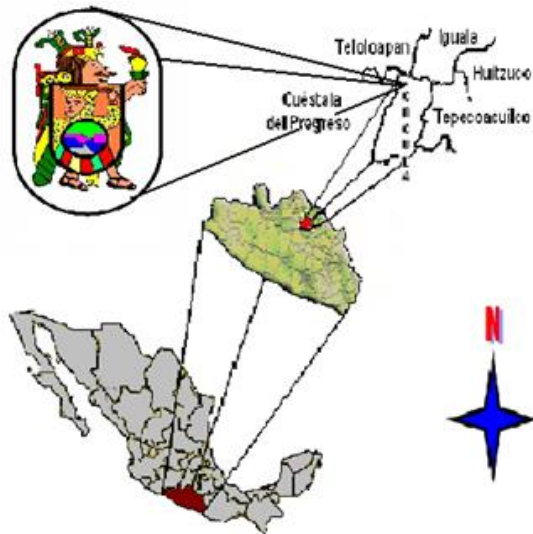
Identificar al agente causal de la pudrición carbonosa en frutos de calabaza pipiana de la región productora de Cocula, de la zona Norte del estado de Guerrero.

**Metodología**

Área de muestreo y material vegetal. En agosto del año 2013 se recolectaron frutos de *C. argyrosperma*, con síntomas de pudrición bajo condiciones de temporal, en el predio correspondiente al campo experimental del Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero, localizado en la zona norte del estado de Guerrero.

En el municipio de Cocula, ubicado geográficamente a 18° 19' Latitud Norte, 99° 39' longitud Oeste, a una altitud de 640 msnm. Presenta suelos planos, en esta región predomina el clima tipo Awo (w) (i') g, que es el más seco de los cálidos semihúmedos.

La precipitación media anual es de 797 mm; las lluvias más frecuentes se presentan en los meses de junio a septiembre. La temperatura media anual varía de 22 a 29 °C; los meses más cálidos son abril y mayo, con 40 °C o más; la mínima es de 10 °C; la topografía regional es uniforme, sin pedregosidad, y con mínima erosión. El suelo de la región es chernozem o negro con textura arcillo-arenosa o franco-arcillosa, con drenaje medio y poca materia orgánica (1.7 %), pH de 7.6 a 7.9 (Figura 1). De los frutos de calabaza con síntomas y signos de pudrición colectados, se tomaron porciones de tejido de 1 cm<sup>2</sup> con partes sanas y enfermas, se lavaron con agua destilada y se desinfectaron por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 1.5%, se enjuagaron con agua destilada estéril durante 3 minutos, posteriormente se colocaron en cajas Petri conteniendo medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA). Después de cinco días de incubación a temperatura ambiente en el laboratorio, se observó el crecimiento micelial, el cual se purificó por punta de hifa en nuevas cajas Petri en los dos medios de cultivo. La obtención de colonias purificadas (monosporicas), se logró mediante la incubación de los aislamientos fungosos a temperatura ambiente, hasta que formaran estructuras sexuales o asexuales y/o cuerpos fructíferos típicos del grupo de hongos para su identificación morfológica.



**Figura 1** Ubicación del área de muestreo.

**Identificación morfológica.** Del cultivo puro obtenido, se realizaron preparaciones en lactofenol, se observaron al microscopio compuesto y se realizó microscopía de barrido; para la identificación se utilizaron las claves taxonómicas de Wantanabe (2002).

**Identificación molecular.** Extracción de DNA. Del hongo purificado e incubado durante 15 días en medio de cultivo PDA, con una asa bacteriológica, se transfirieron de 50 a 100 mg de micelio, a un tubo Eppendorf, se adicionaron 400  $\mu$ L de Buffer AP1 y 4  $\mu$ L de RNasa, se agitó en vortex, se incubaron las muestras en baño maría por 10 min a 65 °C, agitando por inversión 2 ó 3 veces; se adicionaron 130  $\mu$ L de Buffer AP2 y se mantuvieron 5 min en hielo. La mezcla se colocó en la columna QIAshredder Mini spin y se centrifugó por 2 min a 14,000 rpm. Se transfirió el líquido que pasó por la columna a un nuevo tubo Eppendorf, al que se le adicionaron 1.5 volúmenes del buffer AP3/E; se colocó en una columna DNeasy Mini spin, se centrifugó por 1 min a 8 000 rpm, se pasó a un nuevo tubo, se agregaron 500  $\mu$ L del buffer AW; se centrifugó por 1 min a 8 000 rpm, se agregaron otros 500  $\mu$ L del buffer AW y se centrifugó por 2 min a 14, 000 rpm, con el propósito de lavar al ADN; finalmente.

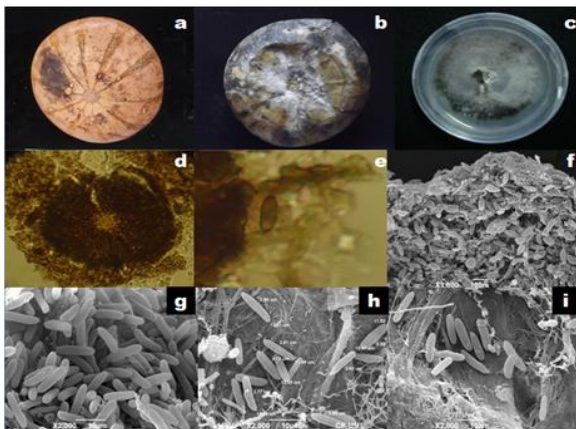
Se transfirió la columna DNeasy Mini spin a un tubo nuevo, se pusieron 100  $\mu$ L de buffer AE del DNeasy para la elución, se incubó por 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó por 1 min a 8,000 rpm (Qiagen, 2012).

**PCR y secuenciación.** Para las reacciones de PCR se utilizó el ADN de 3 muestras de micelio de aislamientos purificados a partir de los frutos de *C. argyrosperma* infectados. Se realizaron reacciones de PCR universal para hongos con los oligos ITS-1fu 5'-tccgtaggtgaacctgcgg-3' y ITS-4 5'-tcctccgcttattgatatgc-3' (White et al., 1990); los cuales amplifican un espaciador intergénico interno (ITS) y generan un producto de talla variable entre 500 y 900 pares de bases (pb) aproximadamente. Esta práctica se realizó con una mezcla de reacción en un volumen final de 25  $\mu$ L, cuyos componentes fueron: amortiguador de reacción 5X, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, dNTP's 200 nM, 20 pmoles de cada oligonucleótido y 1 unidad de Taq DNA polimerasa (Promega). El protocolo consistió en mantener una temperatura a 94°C durante 2 min, seguido de 35 ciclos a 94-55-72 °C durante 30-30-60 seg y una extensión final de 5 min a 72 °C. Los productos de las reacciones de PCR fueron separados por electroforesis en geles de agarosa a 1.5 %, y las bandas se observaron en un transiluminador de luz ultravioleta marca UVP y se tomaron fotografías. Los fragmentos amplificados por PCR fueron secuenciados directamente y se compararon los resultados con las secuencias disponibles en el banco de genes (Gen Bank) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) del Instituto Nacional de Salud (NIH) de E.E.U.U. (Qiagen, 2012).

## Resultados

### Identificación morfológica

El agente causal se identificó como *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid, el cual en medio PDA, formó hifas hialinas que oscurecieron con el tiempo; picnidios negros más o menos esféricos, similares en tamaño, forma y color, a los microesclerocios. Los conidios unicelulares, hialinos y elipsoidales a oviodes. Microesclerocios pequeños, globosos, de color negro muy numerosos, por lo que confirieron a la colonia un color negro-grisáceo, a través del tiempo (Wantanabe, 2002) (Figura 2). El patógeno fue inoculado en frutos sanos de calabaza pipiana y se mantuvo en invernadero hasta que los frutos mostraran los síntomas para comprobar los postulados de Koch.



**Figura 2** *Macrophomina phaseolina*. a) Fruto de *C. argyrosperma* inoculado con *M. phaseolina*, b) Fruto inoculado con *M. Phaseolina*, c) *M. Phaseolina* en medio de cultivo PDA d), e), f), g), h) y i) Picnidios y conidios de *M. phaseolina*.

**Identificación molecular.** Las regiones intergénicas internas ITS de los genes ribosomales (ARNr) amplificadas por PCR del aislamiento identificado morfológicamente como *M. phaseolina* tuvo 859 pares de bases (pb) que concuerda con la talla esperada para la especie.

Las secuencias obtenidas tuvieron un 99 % de similitud con secuencia completa de la región ITS, cuya alineación coincidió con *M. phaseolina* con número de acceso KJ609175.

### Discusión

Las características morfológicas encontradas en el patógeno estudiado coinciden con las del hongo *M. phaseolina* descritas por Zitter et al. (2004). Por su parte Biswas et al. (2012), reporta el empleo de la identificación molecular de *M. phaseolina* basada principalmente con la utilización del ADN del patógeno, con la finalidad de un diagnóstico confiable y como punto de comparación de la identificación morfológica.

### Conclusión

El hongo causante de la pudrición carbonosa de frutos de calabaza pipiana fue *Macrophomina phaseolina*, mismo que fue identificado morfológicamente, y se confirmó la especie mediante la identificación molecular.

### Referencias

Ayvar-Serna S., Mena-Bahena A., Durán-Ramírez J.A., Cruzaley-Sarabia R y Gómez-Montiel N.O. (2007). La calabaza pipiana y su manejo integrado. Folleto técnico. Fundación Produce de Guerrero, A. C. Campo Experimental Iguala. CSAEGro. Iguala, Gro. México. 26 p.

Biswas, C., Dey, P., Satpathy, S., Sarkar, S.K., Bera, A. and Mahapatra, B.S. (2012). A simple method of DNA isolation from jute (*Corchorusolitorius*) seed suitable for PCR-based detection of the pathogen *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *Letters in Applied Microbiology* 56:105-110

Quiagen. (2012). Manual del kit QIAamp® DSP DNA Blood Mini. Versión 2. Alemania.

Wantanabe, T. (2002). Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi. Morphologies of Cultures Fungi and Key to Species. Second edition. CRC Press. New York Washington, D.C. 500 p.

Zitter, T. A., Hopkins, D. L. y Thomas, C.E. (2004). Plagas y enfermedades de las cucurbitáceas. The American Phytopathological Society. Ediciones Mundi Prensa. 88 p.