

Identificación morfológica y molecular de *Colletotrichum Tropicale* Rojas Renher y Samuels causante de la Antracnosis del Noni

PLANCARTE-GALÁN, Pedro Jesús*†, AYVAR-SERNA, Sergio, ALVARADO-GÓMEZ, Omar Guadalupe, DÍAZ-NÁJERA, José Francisco

*Profesor Investigador del Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero. Av. Guerrero 81 Primer piso. Col. Centro. CP. 40,000. Iguala, Gro. Tel. 33-2-43-28.

†Profesor investigador de la facultad de agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León UANL.

Estudiante de Postgrado, programa de horticultura, departamento de fitotecnia, Universidad Autónoma de Chapingo.

Estudiante de Ing. Agr. Fitotecnista del Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero.

Recibido Julio 5, 2013; Aceptado Enero 9, 2014

Resumen

A pesar de que la identificación y taxonomía de hongos tiene muchos años de realizarse usando criterios que incluyen tanto características de su estructura básica (morfología), y ciertos patrones de reproducción, todavía hoy en día existen dificultades para lograr una acertada identificación, porque existen especies muy similares a pesar de estar consideradas en grupos taxonómicos diferentes. La Biología molecular ha venido a corroborar la identidad de organismos en general y de hongos en particular, debido a que se basa en el análisis del genoma, y éste no es influenciado por el ambiente. El principal argumento en favor de la utilización de caracteres moleculares, es que éstos son universales. En muchos casos, principalmente cuando se requiere comparar linajes con divergencia temprana, es imposible establecer hipótesis de homología morfológica; en cambio, existen genes presentes en todos los genomas celulares como los ribosomales, que pueden proveer de información para reconstrucciones filogenéticas, donde los caracteres morfológicos son inaplicables. En los estudios morfológicos, los caracteres deben ser descubiertos y delimitados generalmente sin ningún criterio explícito para la selección o la codificación del carácter, por lo que tienen el riesgo de ser arbitrarios. Por todo lo mencionado anteriormente, resulta oportuna la identificación rápida y confiable de hongos mediante técnicas moleculares, en contraste con la limitación que se tiene cuando se utilizan los caracteres morfológicos para diferenciar hongos estrechamente relacionados, así como la laboriosidad requerida en su estudio y, en algunos casos, la insuficiente resolución que proporcionan a nivel taxonómico. Hasta el momento, se han usado numerosas técnicas moleculares para el estudio taxonómico de los hongos, desde las clásicas técnicas de DNA, basadas en la determinación del contenido guanina/citosina del DNA nuclear hasta la hibridación DNA-DNA, para establecer la identidad o no de cepas morfológicamente similares. El estudio de hongos fitopatógenos mediante técnicas moleculares se ha convertido en una herramienta útil para la diferenciación de hongos estrechamente relacionados, que no se pueden clasificar taxonómicamente con base en sus caracteres morfológicos; por ello surge la inquietud de identificar molecularmente el hongo causante de la antracnosis del noni.

Antracnosis, Noni, Guerrero.

Abstract

Although the identification and taxonomy of fungi has many years performed using criteria that include both features of its basic structure (morphology), and certain patterns of reproduction, yet today there are difficulties in achieving a successful identification, because there are species very similar despite being considered in different taxonomic groups. Molecular biology has come to corroborate the identity of organisms in general and fungi in particular because it is based on the analysis of the genome, and this is not influenced by the environment. The main argument for the use of molecular characters, they are universal. In many cases, especially when it is necessary to compare lineages early divergence, it is impossible to establish hypotheses of morphological homology; however, there are genes present in all cell genomes as ribosomal, which can provide information for phylogenetic reconstructions where morphological characters are inapplicable. In morphological studies, the characters must be discovered and usually delimited without explicit criterion for selection or the character encoding, so you run the risk of being arbitrary. For all of the above, it is timely rapid and reliable identification of fungi using molecular techniques, in contrast to the limitation that exists when morphological characters are used to differentiate closely related fungi and diligence required in their study and in some cases, they provide insufficient resolution taxonomic level. So far, there have been used many molecular techniques to the taxonomic study of fungi, from the classical techniques of DNA, based on the determination of guanine / cytosine nuclear DNA content to the DNA-DNA hybridization, to establish the identity or non-morphologically similar strains. The study of plant pathogenic fungi using molecular techniques has become a useful tool for differentiating closely related fungi that can not be classified taxonomically based on morphological characters; hence the concern of molecularly identify the fungus causing anthracnose of noni arises.

Anthracoze, Noni, Guerrero.

Citación PLANCARTE-GALÁN, Pedro Jesús, AYVAR-SERNA, Sergio, ALVARADO-GÓMEZ, Omar Guadalupe, DÍAZ-NÁJERA, José Francisco. Identificación morfológica y molecular de *Colletotrichum Tropicale* Rojas Renher y Samuels causante de la Antracnosis del Noni. Foro de Estudios sobre Guerrero. Mayo 2013 – Abril 2014, 1-1: 401-405

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

† Investigador contribuyendo como primer autor.

Introducción

A pesar de que la identificación y taxonomía de hongos tiene muchos años de realizarse usando criterios que incluyen tanto características de su estructura básica (morfología), y ciertos patrones de reproducción, todavía hoy en día existen dificultades para lograr una acertada identificación, porque existen especies muy similares a pesar de estar consideradas en grupos taxonómicos diferentes. La Biología molecular ha venido a corroborar la identidad de organismos en general y de hongos en particular, debido a que se basa en el análisis del genoma, y éste no es influenciado por el ambiente. El principal argumento en favor de la utilización de caracteres moleculares, es que éstos son universales. En muchos casos, principalmente cuando se requiere comparar linajes con divergencia temprana, es imposible establecer hipótesis de homología morfológica; en cambio, existen genes presentes en todos los genomas celulares como los ribosomales, que pueden proveer de información para reconstrucciones filogenéticas, donde los caracteres morfológicos son inaplicables. En los estudios morfológicos, los caracteres deben ser descubiertos y delimitados generalmente sin ningún criterio explícito para la selección o la codificación del carácter, por lo que tienen el riesgo de ser arbitrarios. Por todo lo mencionado anteriormente, resulta oportuna la identificación rápida y confiable de hongos mediante técnicas moleculares, en contraste con la limitación que se tiene cuando se utilizan los caracteres morfológicos para diferenciar hongos estrechamente relacionados, así como la laboriosidad requerida en su estudio y, en algunos casos, la insuficiente resolución que proporcionan a nivel taxonómico.

Hasta el momento, se han usado numerosas técnicas moleculares para el estudio taxonómico de los hongos, desde las clásicas técnicas de DNA, basadas en la determinación del contenido guanina/citosina del DNA nuclear hasta la hibridación DNA-DNA, para establecer la identidad o no de cepas morfológicamente similares. El estudio de hongos fitopatógenos mediante técnicas moleculares se ha convertido en una herramienta útil para la diferenciación de hongos estrechamente relacionados, que no se pueden clasificar taxonómicamente con base en sus caracteres morfológicos; por ello surge la inquietud de identificar molecularmente el hongo causante de la antracnosis del noni.

Objetivos

Se plantearon siguientes objetivos:

- Aislar, purificar e identificar morfológica y molecularmente al hongo patógeno causante de la antracnosis del noni.
- Comprobar la patogenicidad del aislamiento fungoso

Metodología

Se obtuvieron muestras de frutos y hojas de noni con antracnosis y manchas cloróticas y necróticas, cortadas en una plantación situada en el Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero a la altura del kilómetro 14.5 de la carretera Iguala-Cocula, entre las coordenadas 18° 19' latitud norte y 99° 39' longitud oeste, a 640 m de altitud, en el Edo de Guerrero.

El aislamiento del hongo se efectuó por medio de la técnica de cámara húmeda para inducir la esporulación y/o crecimiento miceliar fungoso, en trocitos de tejidos enfermos; se incubó una semana; de las partes afectadas que presentaron micelio y esporulación.

Se transfirieron esporas a cajas Petri a través del método de cultivo monospórico, para obtener aislamientos purificados del hongo; los cuales se preservaron en un tubo de ensayo con PDA, para utilizarlos en ensayos experimentales subsecuentes. De la cepa purificada se tomó una muestra y se realizó una preparación en lactofenol y se observaron en el microscopio compuesto las estructuras fungosas (micelio, esporas, conidióforos, conidios, etc.), así como las principales características de importancia taxonómica, como son: el color, septación y ramificación de las hifas; la formación de esporas y el tipo de esclerocio. La morfología observada sirvió de base para la utilización de las claves ilustradas de Barnett y Hunter (1972), que permitieron la identificación del género de los aislamientos obtenidos. Para la identificación molecular del hongo purificado e incubado durante 15 días en medio de cultivo PDA y V8-Agar, con una asa bacteriológica, se transfirieron de 50 a 100 mg de micelio, a un tubo Eppendorf, se adicionaron 400 µL de Buffer AP1 y 4 µL 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 µL 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 µL del buffer AW; se centrifugó por 1 min a 8 000 rpm, se agregaron otros 500 µL 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 µL 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 y para las reacciones de PCR se utilizó el ADN de 5 muestras de micelio aislamientos purificados a partir de los frutos de *M. citrifolia* infectados. Se realizaron reacciones de PCR universal para hongos con los oligos ITS-1 fu 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 µL, cuyos componentes fueron: amortiguador de reacción 5X, MgCl₂ 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). En la prueba de patogenicidad, se utilizaron 8 frutos de noni, al fruto uno se le pegaron discos de PDA, al fruto dos se le hicieron heridas y se le pegaron discos de PDA, al fruto tres se le pegaron discos de PDA+hongo, al fruto cuatro se le hicieron heridas y se le pegaron discos de PDA+hongo, al fruto cinco se le asperjó agua destilada.

Al fruto seis se le hicieron heridas y se le asperjo agua destilada, al fruto siete se le asperjo una solución de agua destilada más los conidios del hongo a una concentración de 15×10^5 y al fruto ocho se le hicieron heridas y se le asperjo la solución de agua destilada+los conidios del hongo.

Resultados

Del tejido infectado de las hojas y fruto de noni, se aisló, purificó e identificó morfológicamente el hongo del género *Colletotrichum*, que se caracteriza por tener un micelio joven blanquecino conforme empieza a envejecer se va tornando de un color oscuro que comienza a perderse para formar acérvulos jóvenes de color anaranjado que al envejecer se tornan de color café oscuro, formando círculos concéntricos, los conidios son de forma elíptica típicas del genero *Colletotrichum* (Figura 1).

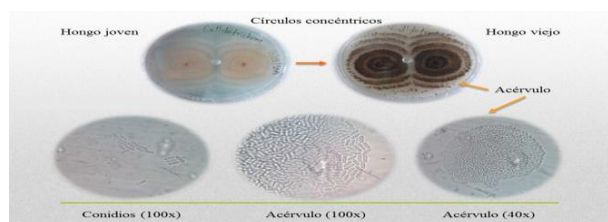


Figura 1 Características morfológicas de *C. tropicale*

En la identificación molecular, el producto obtenido de la secuenciación se comparó en el Gen Bank y se identificaron como *C. tropicale* (Cuadro 1).

El aislamiento purificado de *C. tropicale* al inocularlo en frutos sanos provoca los síntomas característicos de la antracnosis.

Repetición	Identificación molecular	Índice de similitud (%)	Secuencia con mayor similitud
1	<i>Colletotrichum tropicale</i> strain Z1093 elongation factor-1 alpha	98%	gb GU994241.1
2	<i>Colletotrichum tropicale</i> strain Z1093 elongation factor-1 alpha	99%	gb GU994241.1
3	<i>Colletotrichum tropicale</i> strain Z1093 elongation factor-1 alpha	99%	gb GU994241.1
4	<i>Colletotrichum tropicale</i> strain Z1093 elongation factor-1 alpha	99%	gb GU994241.1

Tabla 1 Identificación molecular por PCR-ITS de genes ribosomales de 4 repeticiones del hongo aislado de frutos de noni (*Morinda citrifolia*) basada en la comparación de sus secuencias con la base de datos del National Center for Biotechnology Informat

Discusión

Las lesiones necróticas en hojas y frutos de noni son causados por el hongo *C. tropicale*. Kumar *et al* (2012) citan que en las islas tropicales de Andaman y Nicobar, India el árbol de noni (*Morinda citrifolia*) se ve afectado por distintos hongos del genero *Colletotrichum* que al infectar se notan manchas necróticas en las hojas.

Conclusiones

Los objetivos y resultados de la presente investigación, permiten concluir que:

El hongo aislado, purificado e identificado morfológica y molecularmente pertenece a la especie *Colletotrichum tropicale* Rojas Rehner y Samuels.

El hongo provoca los síntomas típicos de antracnosis al ser inoculado en frutos sanos.

Referencias

Barnett, H. L., and B. Hunter. 1997. Illustrated general imperfect fungi. Third edition. Burgess Publishing Company. Minneapolis, USA. pp. 241.

Kumar, K., Singh, D. R., Amaresan N y Madhuri, K. 2012. Isolation and pathogenicity of *Colletotrichum* spp. causing anthracnose of Indian mulberry (*Morinda citrifolia*) in tropical islands of Andaman and Nicobar, India. *Phytoparasitica*. Volume 40. Number 5. Editorial Springer. pp.9.

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

White, T.J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenies. In: M.A. Inns, D.H. Gelfland, J.J. Sninsky, and T.J. White (eds.). *PCR Protocols*. pp.315-322. Academic Press. San Diego, CA.