

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE HONGOS ASOCIADOS A EXPLANTES DE *Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch PRODUCIDOS *in vitro*

MOLECULAR IDENTIFICATION OF FUNGI ASSOCIATED TO *Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch EXPLANTS PRODUCED *in vitro*

Ramírez-Rojas, S.G.^{1*}; Palacios-Talavera, A.A.¹; Osuna-Canizalez, F.J.¹; Canul-Ku, J.¹; García-Pérez, F.¹; Ornelas-Ocampo, K.²; Landa-Salgado, P.²

¹Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Experimental Zacatepec, Km 0.5 Carretera Zacatepec-Galeana. C. P. 62780, Col. Centro Zacatepec, Morelos, México. ²Posgrado en Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Km 36.5 carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, México. C.P. 56230.

*Autor de Correspondencia: sergioinifap@yahoo.com.mx

RESUMEN

Los explantes producidos *in vitro* de nochebuena (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch) en Morelos, México, tienen problemas con hongos fitopatógenos, y aunque el método de desinfección de explantes está diseñado para eliminar microorganismos saprofitos de la superficie del tejido, algunos resisten este proceso y se transmiten a las plántulas en la fase de aclimatación. Se identificó molecularmente a los hongos asociados a plántulas de *Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch producidos *in vitro*, las plántulas se aclimatizaron en invernaderos; se muestrearon durante los últimos diez días y se recolectaron 20 plantas con manchas necrosadas, de las cuales se aislaron cuatro cepas de hongos para su identificación molecular en medio de cultivo a base de PDA; los aislamientos se amplificaron mediante la técnica de PCR, se secuenciaron y analizaron mediante Chromas Lite[®], y se alinearon con BLAST del GenBank del National Center for Biotechnology Information de USA. Los hongos asociados a plántulas presentaron 100 % de similitud con *Fusarium solani*, *Fusarium verticillioides* y *Fusarium equiseti*.

Palabras clave: vitroplantas, nochebuena, hongos, contaminación.

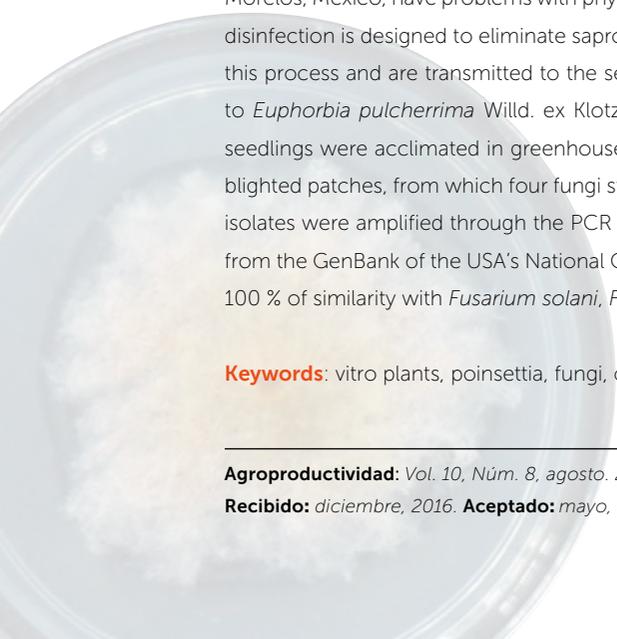
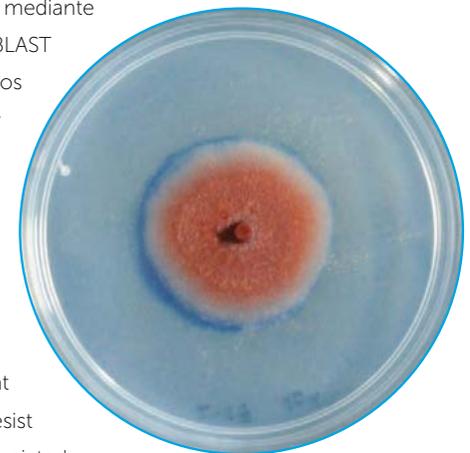
ABSTRACT

The explants of poinsettia (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch) produced *in vitro* in Morelos, México, have problems with phytopathogen fungi, and although the method of explant disinfection is designed to eliminate saprophyte microorganisms of the tissue surface, some resist this process and are transmitted to the seedlings during the acclimation phase. The fungi associated to *Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch seedlings produced *in vitro* were identified molecularly, the seedlings were acclimated in greenhouses; they were sampled during the last ten days and 20 plants were collected with blighted patches, from which four fungi strains were isolated for their molecular identification in a PDA growth medium; the isolates were amplified through the PCR technique, sequenced and analyzed with Chromas Lite[®], and aligned with BLAST from the GenBank of the USA's National Center for Biotechnology Information. The fungi associated to seedlings presented 100 % of similarity with *Fusarium solani*, *Fusarium verticillioides* and *Fusarium equiseti*.

Keywords: vitro plants, poinsettia, fungi, contamination.

Agroproductividad: Vol. 10, Núm. 8, agosto, 2017, pp: 3-7.

Recibido: diciembre, 2016. **Aceptado:** mayo, 2017.



INTRODUCCIÓN

En México, el cultivo de la nochebuena (*Euphorbia pulcherrima* Willd Ex Klotzsch) se ha incrementado de manera sorprendente, convirtiéndose en un cultivo de importancia cultural y económica (Pineda *et al.*, 2008). La nochebuena se encuentra cultivada ampliamente a nivel mundial. Es la planta que más se produce y vende en maceta en América del Norte, Europa, Asia y Australia (Williams, 2005). Las plantas cultivadas de nochebuena en México proceden del extranjero, a pesar de ser originaria de México y Centroamérica, por lo anterior el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Experimental Zacatepec, se propuso generar variedades nuevas, iniciando por recolecta de semillas y varetas de plantas silvestres, semicultivadas y cultivadas en varias regiones de México (Canul *et al.*, 2013), para desarrollar nuevas variedades mediante la recombinación genética (Márquez, 2016), selección recurrente, mutagénesis y reproducción vegetativa (García *et al.*, 2015) *in vitro* (Rangel *et al.*, 2015), actualmente se disponen de genotipos experimentales con alto potencial comercial. La propagación se hace principalmente por esquejes y varetas (García *et al.*, 2011; García *et al.*, 2015). Esta técnica tiene dos limitantes, la primera, es la producción limitada de plantas nuevas a partir de una planta madre sana. Cada planta madre puede producir aproximadamente 400 plantas hijas al año. La segunda limitante, es la transmisión de algunos patógenos de la madre a las hijas. Se ha documentado que algunos patógenos, tales como bacterias, hongos, virus y fitoplasmas se transmiten de plantas madre a la plantas hijas por esta vía (Agrios, 2005). Por lo anterior, se ha propuesto el uso de técnicas alternativas, tales como la propagación *in vitro* (Rangel *et al.*, 2015), que es una técnica utilizada para obtener gran cantidad de plantas a partir de una sola planta madre. El número de plantas hijas que se obtienen por cada madre se incrementa alcanzando hasta 1,000 plantas por mes. Además, esta técnica sirve para obtener plantas libres de patógenos (Milošević *et al.*, 2012). En la fase experimental, la siembra *in vitro* de nuevas variedades de nochebuena del Campo Experimental Zacatepec, han presentado problemas de contaminación con hongos, los cuales están asociados a las plantas madre. Aunque el método de desinfección de los explantes está diseñado para eliminar microorganismos saprofitos de la superficie del tejido, es probable que algunos resistan este proceso, pudiendo transmitirse a los explantes y a las plántulas en la fase *in vitro* y de aclimatación. Para diseñar un método de control efectivo, primero es necesario identificar los hongos asociados con la contaminación de explantes, por lo que se planteo aislar, caracterizar e identificar molecularmente los hongos asociados a plántulas de *Euphorbia pulcherrima*.

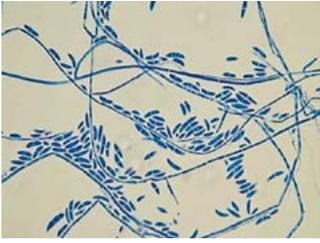
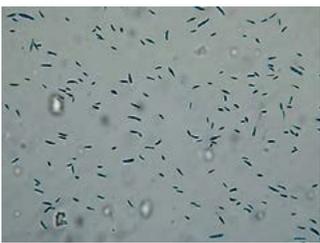
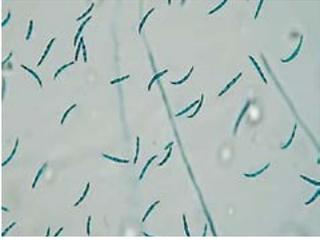
MATERIALES Y METODOS

En explantes *in vitro* de yema de nochebuena se registró contaminación con hongos fitopatógenos, los cuales se sometieron a un proceso de identificación molecular, como se describe a continuación. Se aislaron cepas fúngicas de explantes de nochebuena, tomando muestras de micelio de los explantes de yema de variedades experimentales cultivadas *in vitro* infectados con una aguja de disección previamente desinfectada, y se sembraron individualmente en cajas Petri con agar papa dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés) su-

plementado con ácido láctico (AL) a 25% (PDA-AL), las cajas se incubaron a 25 °C por siete días (punto máximo del desarrollo del hongo). Los aislamientos totales de *Fusarium* de las plantas *in vitro* fueron cuatro. Una vez que se obtuvieron cepas puras de este patógeno, se inició el procedimiento para la obtención de cultivos monospóricos de cada cepa fúngica. A las cajas Petri que contenían el hongo puro, se les agregó 10 mL de agua destilada estéril, cubriendo completamente. La caja se agitó con movimientos suaves para desprender y con una micropipeta se extrajeron 200 μ L de la suspensión. La concentración de esporas se determinó contando el número de conidios en una cámara Neubauer colocada en un microscopio compuesto. De las suspensiones obtenidas, se realizaron diluciones hasta obtener 1.5×10^8 conidios por mililitro. De esta última, se tomaron 30 μ L y se plaquearon en cajas Petri con PDA-AL25, las cajas se incubaron a 25 °C por 24 h. Pasado este tiempo, las siembras se observaron en microscopio para buscar esporas aisladas y en desarrollo. Se seleccionó el micelio y se sembró en cajas Petri con PDA-AL25 e incubadas por siete días, para que el hongo se desarrollara en un cultivo monospórico. Además, se dio seguimiento al crecimiento radial de cada cepa, a la producción de macroconidios y otras estructuras para su caracterización morfológica (Cuadro 1). Las esporas de las cepas monospóricas se guardaron a -30 °C en una solución de agua-glicerol a 15 %.

Para observar las estructuras de los macroconidios y microconidios, se tomó un pedazo de micelio del hongo con una aguja estéril y se depositó en un portaobjetos limpio. A la preparación se le agregó

Cuadro 1. Crecimiento de cuatro tipos de hongos sembrados en cajas Petri de plántulas y explantes de *Euphorbia pulcherrima* Willd Ex Klotzsch *in vitro*, observadas el primer día de evaluación morfológica, y a siete días de incubación e identificado molecularmente.

Hongos entomopatógenos sembrados y aislados en cajas Petri con medio de cultivo PDA+AL	Tipo de crecimiento del hongo en caja a siete días de evaluación	Identificado molecularmente como
		<i>Fusarium solani</i>
		<i>Fusarium verticillioides</i>
		<i>Fusarium verticillioides</i>
		<i>Fusarium equiseti</i>

Para la identificación molecular de las cepas de *Fusarium*, se obtuvo con un sacabocados de 3.4 mm de diámetro, una porción de agar de un cultivo monospórico de cada hongo crecido en PDA+AL de siete a diez días. La porción de agar se colocó dentro de un matraz de 125 mL con 25 mL de medio mínimo líquido (MM). Los hongos se dejaron crecer en agitación a 200 rpm de entre tres y cinco días a 25 °C. Transcurrido este periodo de tiempo, el caldo con el hongo se filtró con un embudo en el que se colocó una pieza de papel filtro sobre un matraz Erlenmeyer para vaciar el contenido total del matraz con el crecimiento de cada hongo. Una vez filtrado el micelio se pesaron 100 mg y se procedió a usar el kit DNeasy Plant Mini Kit de Qiagen® (Cat. 69106), siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. La extracción e integridad del DNA se verificó en un gel de agarosa 1%. La reacción de PCR se realizó utilizando los oligonucleótidos ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'), para la amplificación de los espacios transcritos internos (ITS, por sus siglas en inglés) situados entre los genes ribosomales (rARN) 18S-5.8S y 5.8S-28S (White *et al.*, 1990), el DNA genómico se usó como templado. La reacción se llevó a cabo en un termociclador (Techné® PHC-39, en un volumen final de 25 μ L, los cuales contenían buffer 1x, 200 μ M de dNTP's, 0.4 μ M de cada oligonucleótido, 1 μ L de enzima GoTaq de Promega® (Cat. M8295) y 1 μ g de DNA genómico. El programa de PCR consistió en un paso inicial de desnaturalización a 94 °C por 5 min, seguido por 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 61 °C por 30 s y 72 °C por 30 s, y un paso final de 72 °C por 5 min. El análisis de PCR

0.05 mL de lactofenol, y colocó un cubreobjetos limpio. La muestra se observó en un microscopio compuesto a 60 X. Cada cepa de los hongos a identificar se sembró en una caja Petri con PDA+AL y se incubó de siete a diez días; después con un sacabocados de 3.4 mm de diámetro se tomó una porción del agar con el hongo crecido y se depositó en cajas nuevas con PDA+AL. Las nuevas cajas con los hongos se cultivaron por diez días, y tomaron lecturas diarias del hongo midiendo con un vernier el diámetro del micelio siempre a la misma hora. El ritmo de crecimiento se estimó calculando la diferencia del diámetro del micelio por cada día hasta llegar a los diez días de crecimiento. Los valores de las diferencias de los diámetros del crecimiento del hongo, se promediaron para calcular el ritmo del crecimiento.

se llevó por electroforesis en gel de agarosa 1.2 % a 85 V durante 35 min, con 5 μ L de cada muestra. El gel se tiñó con bromuro de etidio (0.5 μ g mL⁻¹) y se observó en un transiluminador. Las reacciones de PCR dispuestas para secuenciación se trataron con DNA Clean & Concentrator™-25 Kit de Zymo (Cat. D4033). Posteriormente, se cuantificó el DNA en un Nanodrop (Epoch, BioTek). La reacción de secuenciación consistió en 10 ng de DNA por cada 100 pb, 1 μ L de oligo (10 pmol), en un volumen final de 16 μ L. La secuenciación se llevó a cabo en el Instituto de Biotecnología de la UNAM, con el equipo Perkin (Elmer/Applied Biosystems Modelo 3730), mediante el método Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Fluorescence-Based Sequencing. Las secuencias obtenidas se analizaron con el programa Chromas Lite® y posteriormente, con BLAST (The Basic Local Alignment Search Tool: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) para su alineamiento con la base de datos del GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI), USA. De los valores cuantitativos generados de máxima identidad, sólo se consideraron los mayores (Cuadro 2).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las cuatro cepas de *Fusarium* aisladas se identificaron tres géneros: solani (una cepa), verticillioides (dos cepas), y equiseti (una cepa). La cepa FUSNB 13 tuvo 100 % de identidad máxima con *F. solani* (Cuadro 2). Este es un fitopatógeno que ataca gran variedad de plantas, especialmente árboles; ha sido reportado como patógeno de especies fabáceas y otras plantas tropicales donde se le asocia con canchros y con marchitamiento de árboles (Nelson *et al.*, 1981). También se reportan afectaciones de *F. solani* en el cultivo de fresa (*Fragaria vesca*)

causando podredumbre de la corona y raíz en el suroeste de España. Los síntomas observados fueron marchitez del follaje, enanismo y deshidratación, muerte de las hojas más viejas, además de que el tejido vascular de la corona de las plantas mostró una decoloración naranja a marrón (Pastrana *et al.*, 2014). En China provocó la pudrición de la raíz y cancro del tallo en camote (*Ipomoea batata*). Durante el almacenamiento de las raíces se observaron lesiones en la superficie de éstas. Las lesiones consistieron en anillos concéntricos de color marrón, ligeramente cóncavas extendidas hacia el centro de las raíces (Wang *et al.*, 2016).

Las cepas de *Fusarium verticillioides* (FUSNB L-17 y FUSNB 20) se identificaron con 100 % de la secuencia obtenida del GeneBank (Cuadro 2). Este hongo, se distribuye ampliamente en todo el mundo, y se asocia particularmente con el maíz (*Zea mays* L.), donde puede causar pudrición del tallo y podredumbre de la mazorca, lo cual provoca importantes pérdidas de rendimiento y reducciones de la calidad del grano (Gulya *et al.*, 1980). En sorgo provoca marchitamiento severo, un color pajizo en los entrenudos inferiores y la médula interna rojiza, suave y desintegrada (Palmero *et al.*, 2014).

F. equiseti (cepa FUSNB 25) (Cuadro 2), provoca manchas acuosas en la superficie superior de las hojas de arroz (*Oryza sativa*) que inicialmente eran color marrón y después de cuatro días desarrollaron un halo amarillo, causando una apariencia deteriorada. Las hojas enfermas se marchitaron y las plantas murieron (Gupta *et al.*, 2013). La Figura 1 muestra los resultados de la amplificación de un fragmento de 500 pb por PCR de los ITS de *Fusarium*, con los oligos ITS1 e ITS4.

Cuadro 2. Resultados de la identificación molecular de especies de *Fusarium* sp., aisladas de plantas de *Euphorbia pulcherrima* Willd Ex Klotzsch crecidas *in vitro*.

Cepa	No. Acceso	Descripción	Máxima identidad (%)
FUSNB 13	AB705146.1	<i>Fusarium solani</i> genes for 18S rRNA ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA partial and complete sequence	100
FUSNB L-17	KF679758.1	<i>Fusarium verticillioides</i> isolate L1W internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer	100
FUSNB 20	KF679758.1	<i>Fusarium verticillioides</i> isolate L1W internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer	100
FUSNB 25*	KC981102.1 KC311517.1	<i>Fusarium equiseti</i> isolate SC1104_10 18S ribosomal RNA gene, partial sequence internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene	100

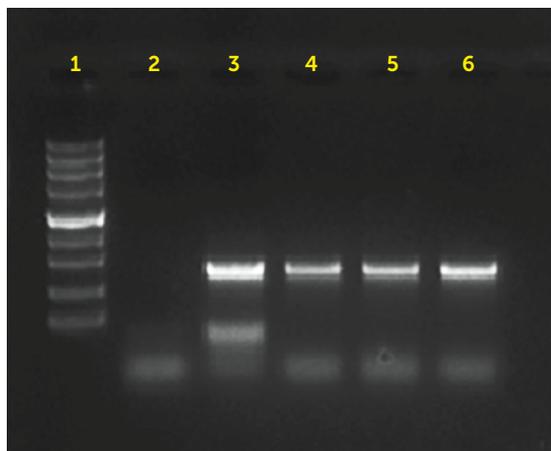


Figura 1. Amplificación de un fragmento de 500 pb por PCR de los ITS de *Fusarium*, con los oligos ITS1 e ITS4. 1. Marcador de peso molecular #SM1373 (Fermentas®); 2. Control negativo (mezcla del mix con agua destilada estéril); 3. FUSNB 13; 4. FUSNB L17; 5. FUSNB 20 3; 6. FUSNB 25.

CONCLUSIONES

Se logró el aislamiento e identificación morfológica y molecular de cepas de *Fusarium solani*, *Fusarium verticillioides* y *Fusarium equiseti*, en plantas de nochebuena cultivadas *in vitro*, en la etapa de aclimatación, para diseñar un programa de sanidad en la multiplicación *in vitro*.

LITERATURA CITADA

- Agrios G.N. 2005. Plant pathology (Vol. 5). Burlington: Elsevier Academic Press.
- Canul K.J., García P.F., Osuna C.F., Ramírez R.S., Barrios G.E. 2013. Recursos genéticos de nochebuena en México, Colecta de germoplasma para mejoramiento genético. Ciencia y Tecnología Agropecuaria de México 1:20-26.
- García P.F., Canul K.J., Ramírez R.S., Osuna C.F. de J. 2011. Enraizamiento de varetas para la propagación de nochebuena de sol. Folleto técnico No. 58 INIFAP, Campo Experimental de Zacatepec, Morelos. ISBN: 978-607-425-698-7.
- García P.F., Canul K.J., Osuna C.F., Ramírez R.S., Rangel E.S., Portas F.B. 2015. Propagación de nochebuena de sol. Instituto Nacional de

Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Zacatepec, Morelos. Publicación Especial Núm. 57.45 p.

- Márquez M.M. 2016. Evaluación de progenies de cruza dobles de nochebuena (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch) en Morelos. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. 42 p.
- Gulya T., Martinson C., Loesch P. 1980. Evaluation of inoculation techniques and rating dates for *Fusarium* ear rot of opaque-2 maize. Phytopathology, 70(11), 1116-1118.
- Gupta S., Bhar A., Chatterjee M., Das S. 2013. *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* race 1 induced redox state alterations are coupled to downstream defense signaling in root tissues of chickpea (*Cicer arietinum* L.). 8 (9), 73-163.
- Milošević S., Cingel A., Jevremović S., Stanković I., Bulajić A., Krstić B., Subotić A. 2012. Virus elimination from ornamentals plants using *in vitro* culture techniques. Pestic. Phytomed 27 (3): 203-2011.
- Nelson P.E., Toussoun T.A., Cook R.J. 1981. *Fusarium*: diseases, biology and taxonomy. Pennsylvania State University Press.
- Rangel E.S.E., Canul K.J., Osuna C.F.D.J., García P.F., Rosario M.P.D., Vences H.Á.S. B., Hernández M.E. 2015. Regeneración *in vitro* de híbridos de nochebuena vía organogénesis. Revista mexicana de ciencias agrícolas, 6(7), 1571-1585.
- Palmero D., Rubio M.A., Galvez P.L., Nogueras J., Abato C., Gómez G.L., Ahrazem O. 2014. Pathogenicity and genetic diversity of *Fusarium oxysporum* isolates from corms of *Crocus sativus*. Industrial Crops and Products, 61, 186-192.
- Pastrana A.M., Ureba M.B., Capote N. 2014. *Fusarium solani*: un nuevo patógeno en el cultivo de la fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) en España. Phytoma España: La revista profesional de sanidad vegetal, 257, 42-46.
- Pineda P.J., Castillo G.A.M., Morales C.J.A., Colinas L.M.T., Valdez A.L.A., Avitia G.E. 2008. Efluentes y sustratos en el desarrollo de nochebuena. Revista Chapingo. Serie horticultura 14(2), 131-137.
- Wang R.Y., Gao B., Li X. H., Ma, J., Chen S.L. 2016. First report of *Fusarium solani* causing *Fusarium* root rot and stem canker on storage roots of sweet potato in China. Plant Disease, 100(3) 650-650.
- White T.J., Bruns T., Lee S.J.W.T., Taylor J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetic. PCR protocols: a guide to methods and applications, 18(1), 315-322.
- Williams J. 2005 Poinsettia production. FlowerTech 8: 6-9.