

## Diagnóstico rápido para la identificación de fitopatógenos que ocasiona la enfermedad de marchitez en Chile (*Capsicum annuum*)

"Rapid diagnosis for the identification of phytopathogens that cause wilt disease in Chile (*Capsicum annuum*)."

Lizbeth Alejandra Rodríguez Morales<sup>1\*</sup>, Brenda Zulema Guerrero Aguilar<sup>2</sup>, Mario M González Chavira<sup>2</sup>, José Luis Pons Hernández<sup>2</sup> y Laura Mejía Teniente<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad de Guanajuato, <sup>2</sup>INIFAP Campo Experimental del Bajío  
larodriguezmorales@ugto.mx \*

### Resumen

El cultivo del chile es afectado por un complejo de patógenos como *P. capsici*, *Fusarium* spp. y *R. solani*, que causa la marchitez de chile, la cual causa grandes pérdidas del cultivo. Para enfrentar este problema es necesario el diagnóstico rápido y correcto del o los patógenos que estén afectando al cultivo. Se planteó el objetivo de desarrollar un método rápido para la detección de fitopatógenos que causan la enfermedad de la marchitez del chile por medio de PCR, de manera rápida y económica. Para esto, se evaluaron siete protocolos de extracción de ADN, los cuales difieren en el buffer de lisis, empleando plántulas de chile, inoculadas con los tres patógenos, utilizando tejido de hoja, tallo, raíz y haces vasculares. La calidad del ADN extraído se comprobó con el gen ribosomal 26S. Para la identificación de los patógenos se emplearon cebadores que flanquean la región ITS, para *Fusarium* spp (ITS-Fu-F y ITS-Fu-R), *P. capsici* (PC1 y PC2) y para *R. solani* se utilizaron cebadores (RhFP y ITS1 para cepas no patogénicas y RhP y ITS1 para cepas patogénicas). Los resultados obtenidos indican que el protocolo cinco fue el eficiente en calidad y concentración de ADN. En cuanto a la amplificación, se obtuvieron tamaños de fragmento superiores a los esperados. El tiempo de identificación de los patógenos es de 7 horas con este método, mientras que con el método tradicional se requieren por lo menos dos días para su identificación. El método de identificación rápido propuesto es más barato que el método tradicional.

**Palabras clave:** Marchitez del chile. PCR. Extracción rápida de ADN.

### Abstract

The chili crop is affected by a complex of pathogens such as *P. capsici*, *Fusarium* spp. and *R. solani*, which causes chili wilt, which causes great crop losses. To face this problem, a rapid and correct diagnosis of the pathogen(s) affecting the crop is necessary. The objective was to develop a rapid method for the detection of phytopathogens that cause chili wilt disease by means of PCR, in a fast and economical way. For this, seven DNA extraction protocols were evaluated, which differ in the lysis buffer, using chili seedlings, inoculated with the three pathogens, using leaf, stem, root and vascular bundle tissue. The quality of the extracted DNA was checked with the ribosomal gene 26S. For the identification of pathogens, primers flanking the ITS region were used, for *Fusarium* spp (ITS-Fu-F and ITS-Fu-R), *P. capsici* (PC1 and PC2) and for *R. solani*, primers (RhFP and ITS1 for non-pathogenic strains and RhP and ITS1 for pathogenic strains) were used. The results obtained indicate that protocol five was the most efficient in terms of DNA quality and concentration. Regarding amplification, fragment sizes larger than expected were obtained. The identification time of pathogens is 7 hours with this proposed method, while with the traditional method at least two days are required for their identification. The rapid identification method proposed is cheaper than the traditional method.

**Keywords:** Chili wilt. PCR. Rapid DNA extraction.

### Introducción

México es considerado uno de los principales países con actividad hortícola por la superficie de siembra que se le dedica al cultivo del chile, siendo el cuarto productor más importante, con una producción de 2,584,143.6 toneladas, según la FAOSTAT en el 2021. El interés por este cultivo no se centra únicamente en su importancia económica y consumo

humano; también se ha demostrado que es una fuente excelente de colorantes naturales, minerales y vitaminas A, C y E. Además, es utilizado en la medicina en varios productos farmacéuticos hechos a base de extracto de Chile para aliviar distintos dolores musculares y en la industria para la elaboración de pinturas, barnices, gases lacrimógenos, entre otros productos (Baenas et al., 2019; De la Cruz Ricárdez, 2020; Ruiz Lau et al., 2011).

El cultivo de Chile se ve afectado por distintos microorganismos durante su etapa de producción y cosecha. Dentro de estos se encuentran hongos, bacterias, virus y nematodos, cuyo daño varía de acuerdo con el microorganismo que lo ataca (Laborde Cancino et al., 1984).

Las principales enfermedades del cultivo del Chile encontradas en el centro y norte de México son: pudrición de raíz, marchitez del Chile por *Phytophthora*, nemátodos formadores de agallas de las raíces, ahogamiento de los almácigos, mancha foliar por *Alternaria*, cenicilla polvorienta, mancha bacteriana y algunas enfermedades provocadas por virus y fitoplasmas (Velásquez Valle et al., 2013).

La marchitez del Chile, también conocida como la tristeza del Chile, es una enfermedad de gran importancia. Esta enfermedad es responsable de pérdidas de rendimiento desde un 10 a un 100% (Fernández Pavía et al., 2013). Se han reportado los siguientes patógenos como responsables de la marchitez del Chile: *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *capsici*, *Rhizoctonia* spp., *Sclerotium rolfsii*, *Verticillium dahliae*, *V. albo-atrum*, y *Pythium* spp. Se han detectado que provocan diversos síntomas como la marchitez, clorosis y defoliación en plantas de Chile, pudrición del fruto, etcétera (Velásquez Valle et al., 2001).

El diagnóstico de las enfermedades de forma rápida y precisa evita el uso desmedido o incorrecto de compuestos químicos. El cual es fundamental para la implementación de medidas de control efectivas, la optimización de los recursos, la reducción de los efectos negativos al medio ambiente y a la vez generar información respecto a la interacción patógeno hospedante (Barnes, 1994). Hasta hace unos años, la detección de patógenos dependía de métodos de aislamiento, cultivo *in vitro* e identificación con un tiempo promedio de 5 a 10 días y con el requerimiento de una persona calificada con mucha experiencia, habilidad y conocimiento de la taxonomía de los microorganismos. El uso de técnicas modernas ha permitido una detección de patógenos más eficiente con mayor rapidez y precisión. El uso de kits rápidos de detección proporciona un resultado en minutos, sin embargo, estos además de ser costosos, no son fiables y es necesaria la confirmación mediante análisis de laboratorio (TEST *Phytophthora*, s. f.). La detección por medio de técnicas moleculares resulta más rápida que los métodos tradicionales y mayormente específicas que los kits de detección, permitiendo resultados fiables y precisos, minimizando las pérdidas en los cultivos y, además, la reducción de costos (Tegli et al., 2002). Desafortunadamente, estas metodologías, a pesar de haber reducido el tiempo de diagnóstico a la mitad, siguen siendo en algunos casos muy tardadas, dándole tiempo a que se propague la enfermedad hasta afectar significativamente el rendimiento del cultivo. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es desarrollar un método rápido para la detección de fitopatógenos que causan la enfermedad de la marchitez del Chile por medio de técnicas moleculares, de manera rápida y económica.

Abd Elsalam et al. (2003) desarrollaron dos cebadores selectivos de taxones para una identificación rápida del género *Fusarium*, ITS-Fu-F e ITS-Fu-R, se diseñaron comparando secuencias ITS de una variedad de especies de *Fusarium*. Amplificando el ITS1, el ITS2 y el ADNr inversor 5.8S. siendo una buena propuesta para la identificación de *Fusarium* de manera específica. Con un tamaño de amplificado de 398 pb.

Zhang et al. (2006) desarrollaron los cebadores PC-1 y PC-2 para la detección del oomiceto *Phytophthora capsici* mediante la comparación de secuencias ITS, en el ITS1, el gen 5-8s ARNr y el ITS2. Con un tamaño de amplificado de 560 pb.

Crespo Muñoz (2013) diseñó dos cebadores específicos para la identificación de *R. solani*, de la región ITS-5.8s-DNAr, comparando polimorfismos de secuencias conservadas en los grupos de anastomosis. Los iniciadores diseñados fueron: RhP (5'-AGCAGGTGTGAAGCTGCAAT-3') y RhnP (5'-GACCTCCAATACCAAAGCAG-3'). La PCR con los iniciadores RhP y ITS1 con un tamaño de fragmentos esperado de 500 pb permite identificar aislados patogénicos de los grupos de anastomosis AG4 y AG1 y con los iniciadores RhFP y ITS1 con un tamaño de fragmento de 450 pb permite identificar aislados patogénicos del grupo de anastomosis AG4, estos iniciadores son comprometedores, ya que permiten detectar *R. solani* y distinguir los grupos de anastomosis a los que pertenecen.

## Metodología

Se usaron plantas en la etapa fenológica de seis a ocho hojas verdaderas de tipo Chile ancho, las cuales fueron inoculadas en el cuello de la raíz con la mezcla de una solución de esporas de *Fusarium oxysporum* a una concentración de  $1 \times 10^6$  conidios por mL, dos discos de micelio de *Phytophthora capsici* de 8mm y dos discos de micelio de *Rhizoctonia*



*solani* de 8mm (Rico Guerrero et al., 2004). Después de diez días de la inoculación, se tomaron plantas completas con síntomas de marchitez, las cuales se congelaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para posteriormente ser procesadas. En trabajos previos se determinó que, a los siete días de la inoculación el patógeno ha invadido la planta y se encuentra en cantidad suficiente para poder ser identificado por PCR.

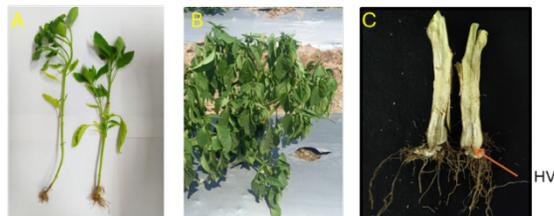


Figura 1. Material vegetal. A. plántulas de chile enfermas. B. planta adulta de campo. C. Visualización de los haces vasculares. Fuente: Elaboración propia.

**Extracción de ADN de micelio del hongo y oomiceto.** Los aislados *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici* y *Rhizoctonia solani*, se incrementaron en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa conocido como PDA, posteriormente, cuando el micelio invadió toda la caja se raspó con una navaja de bisturí para la realización de extracción de ADN fúngico, se utilizó el método descrito por Velarde 2018 modificado. El ADN se cuantificó por espectrofotometría (NanoDrop-8000 Thermo Scientific) y se homogeneizó a  $20\text{ ng}/\mu\text{L}$ . Se visualizó el ADN en un gel de agarosa 1.5%, con amortiguador de corrida TBE 1X a un voltaje de 110.

*Estandarización del método de extracción de ADN rápido en tejido vegetal.*

Se evaluaron siete protocolos de extracción rápida de ADN total en plantas de chile reportados en la literatura por Acevedo Bedoya et al. (2007), los cuales difieren del método de lisis celular, tomando muestra de 3 secciones de la planta, 0.02 g de muestra de hoja, 0.02 g de raíz y 0.02 g de tallo. Cada uno de los tejidos tomados (hoja, raíz y tallo) se procesaron por separado, tomando los tiempos de ejecución por protocolo, concentración y pureza del ADN extraído. Se realizaron 3 repeticiones por protocolo.

**Protocolo 1: Buffer STE más  $\beta$ -Mercaptoetanol.** Las muestras se maceraron en mortero, aplicando  $1000\text{ }\mu\text{L}$  de buffer STE y  $10\text{ }\mu\text{L}$  de Mercaptoetanol, posteriormente se colocaron en tubos de 1.5 mL para calentar a  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos. Posterior a ello se centrifugaron durante 5 minutos a 13,000 rpm. Se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo para la reacción de PCR.

**Protocolo 2: Agua destilada** Cada unidad de muestreo se depositó en tubos de 1.5 mL y se maceró en  $100\text{ }\mu\text{L}$  de agua destilada, desionizada y filtrada; luego, se centrifugó a 12,000 rpm por 3 minutos, se recuperó el sobrenadante para la reacción de PCR.

**Protocolo 3: Buffer TE** Las muestras se maceraron en  $100\text{ }\mu\text{L}$  del buffer TE (10 mM de tris-HCl y 1 mM de EDTA, pH 8,0). En este buffer se almacenaron las muestras a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante media hora, y luego se centrifugaron a 12,000 rpm por 3 min. El sobrenadante se usó para la reacción de PCR.

**Protocolo 4: Buffer TE más proteinasa K** Las muestras se maceraron en  $100\text{ }\mu\text{L}$  del buffer de lisis (10 mM de tris-HCl, pH 8,0, 1 mM de EDTA,  $100\text{ }\mu\text{g. mL}^{-1}$  de proteinasa K) y se desnaturalizaron a  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos. Esta mezcla se usó para la reacción de PCR.

**Protocolo 5: Buffer de PCR 10X más proteinasa K** Las muestras se maceraron en  $100\text{ }\mu\text{L}$  del buffer 10X PCR (100 mM tris-HCl, pH 9,0, 500 mM KCl y 1% de tritón x100) más  $20\text{ }\mu\text{L}$  de proteinasa K ( $100\text{ }\mu\text{g. mL}^{-1}$ ), y se desnaturalizaron a  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos, se centrifugaron a 13,000 rpm por 5 minutos y se tomó el sobrenadante. El sobrenadante se precipitó con  $600\text{ }\mu\text{L}$  isopropanol y  $100\text{ }\mu\text{L}$  de acetato de amonio al 7.2 M y se colocó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 30 min, posteriormente, se centrifugó a 10,000 rpm por 15 min, se descartó el sobrenadante, se secó la pastilla a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 40 min, y finalmente, se suspendió en  $50\text{ }\mu\text{L}$  del buffer TE para ser usado en la reacción de PCR.

**Protocolo 6: Buffer STE** Las muestras se maceraron en  $100\text{ }\mu\text{L}$  del buffer STE (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0; 0.1 M NaCl), se desnaturalizaron a  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 5 min, y luego se colocaron en hielo para usarlas posteriormente en reacciones de PCR.

**Protocolo 7: Desnaturalización completa** Las muestras se colocaron en tubos de 1.5 mL con  $100\text{ }\mu\text{L}$  de agua destilada y se sometieron a ebullición en un baño de agua por 30 minutos, para ser usado en la reacción de PCR.

**Protocolo 8: Buffer de lisis de Collins et al, 1987.** Las muestras se maceraron en 500 µL de buffer de extracción (Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,1 M, Sucrosa 0,2 M, EDTA 0,05 M, SDS 0,5%), se adicionaron 25 µL de RNase A (1mg.mL<sup>-1</sup>) mezclándolos mediante vórtex y se incubaron en un baño de agua a 65 °C por 30 minutos. Posteriormente, se adicionaron 120 µL de KOAc (5M), se centrifugó la muestra por 5 minutos a 13,000rpm y se recuperó el sobrenadante. El ADN se purificó dos veces, con la adición de un volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (24:24:1 pH 8,0) y la solución se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min. Se tomó el sobrenadante, y se precipitó el ADN en un tubo nuevo con la adición de un volumen de etanol frío al 95%, y una décima de volumen de acetato de amonio, durante 1 hora a 4 °C. Luego, se centrifugó a 10,000 rpm por 15 min, se descartó el sobrenadante, se secó el pellet en una cámara de vacío por 45 minutos, y finalmente, se suspendió en 50 µL del buffer TE para usarla posteriormente en reacciones de PCR. El protocolo 8 fue considerado como control positivo, ya que es el método tradicional por el cual la mayoría de los autores realizan la extracción de ADN de hongos .

*Comprobación de la extracción por medio de PCR utilizando 26S.*

Se usó el gen ribosómico constitutivo 26S, para la confirmación de la calidad del ADN extraído por medio de la técnica de PCR de acuerdo con el procedimiento de Montero Tavera et al. (2017). El gen ribosomal 26s es el gen con menor variación entre cultivares y tratamientos, sometidos en condiciones de estrés, siendo una referencia estable para el estudio por PCR. La mezcla de reacción de 25 µL, se adicionó un potenciador de albúmina sérica bovina (BSA) y DMSO, al 1%, 5 µM de cebador 26 S, 2.5 µM dNTP, 10X amortiguador de reacción (50 µM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 9.0 [25 °C]) 1U de *Taq* ADN polimerasa; 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, y 60 ng de ADN extraído. Los ciclos para el PCR fueron; 94 °C por 5 min. 25 ciclos a 94 °C por 30 s, 60 °C por 1 min, fase de extensión de 72 °C por 1 min y la fase de terminación de 72 °C por 5 min. Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa 1.5%, en amortiguador de corrida TBE 1X, con la adición de 8 µL de buffer de carga Orange G con Gel Red (Biotium), como marcador de peso molecular se usó 1Kb plus, se corrió a 110 V y se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta, esperando un tamaño de amplificación de 200 pb.

*Detección de Fusarium spp, Phytophthora capsici y Rhizoctonia solani en plantas de Chile por medio de PCR.*

La identificación se realizó en plántulas y plantas adultas de Chile con síntomas de marchitez, se utilizaron cebadores para la identificación de los tres patógenos como se muestra en la tabla 1, los cebadores utilizados para el género *Fusarium* fueron ITS-Fu-F y ITS-Fu-R, para *P. capsici* se utilizó PC1 y PC2 y para *R. solani* se utilizaron los cebadores RhnP y ITS1 para cepas no patogénicas y con los cebadores RhP y ITS1, para cepas patogénicas. Se utilizaron las mismas condiciones de reacción para el PCR: 95 °C por 2 min; 30 ciclos a 94 °C por 1 min, fase de hibridación (T<sub>m</sub> según el par de oligos) por 30 s, fase de extensión 72°C por 1 min y la fase de terminación de 72°C por 5 min. Además, como control, se amplificó el ADN de cada uno de los patógenos que causan la marchitez de Chile.

**Tabla 1.** Iniciadores usados en la detección de *Fusarium spp*, *Phytophthora capsici* y *Rhizoctonia solani*.

Nombre	Secuencia 5' - 3'	Detección	Pb	Tm (°C)	Fuente
Fu-F Fu-R	CAACTCCCAAACCCCTGTGA GCGACGATTACCGTAACGA	<i>Fusarium</i> sp.	398	58	Abd- Elsalam et al. (2003)
PC-1	GTCTTGATCCCTATCATGCG	<i>P. capsici</i>	560	70	Zapata et al. (2012)
PC-2	CGCCACAGCAGGAAAAGCATT				
RhP	AGCAGGTGTGAAGCTGCAAT	<i>R. solani</i>	500	55	Crespo (2013)
RhnP	GACCTCCAATACCAAAGCAG		450	52	
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG				

*Validación de la técnica de diagnóstico rápido en plantas de Chile con marchitez provenientes de parcelas de agricultores.*

Se recolectaron plantas adultas de Chile en parcelas de productores en Dolores Hidalgo, Gto. La selección se hizo considerando los síntomas reportados para la marchitez del Chile. Se tomaron muestras de hoja, tallo y raíz, las cuales se procesaron siguiendo el procedimiento descrito por el tratamiento 5 para cada una de las unidades de muestreo, sin embargo, no se obtuvieron los resultados esperados. Se realizó un raspado de los haces vasculares con síntomas de

daño para la extracción de ADN, de la cual se logró obtener ADN de calidad y cantidad necesaria para la amplificación por PCR. El ADN extraído se homogeneizó a 20 ng/μL, se visualizó en electroforesis en gel de agarosa al 1.5% colocando 4 μl de ADN y 4 μL de buffer de carga Orange G con Gel Red (Biotium) y como marcador de peso molecular se utilizó λ25, se corrió a 110 V y se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta. Se tomaron los datos de pureza y concentración del ADN extraído.

Para la amplificación se usaron los Oligos Fu-F y Fu-F para identificar el género *Fusarium* y los oligos PC1 y PC2 para la identificación de *Phytophthora capsici*, siguiendo las condiciones de PCR para cada uno de los oligos descritas con anterioridad, usando el ADN extraído a partir de haces vasculares.

## Resultados y discusión

Protocolo rápido y eficiente de extracción de ADN para la identificación de patógenos de raíz mediante PCR.

De los siete protocolos evaluados, el protocolo 5 (Buffer de PCR 10X más proteinasa K) y 8 (Buffer de lisis de Collins et al, 1987), se visualizaron los fragmentos de ADN en gel de agarosa al 1.5% en su totalidad de las muestras analizadas, observando una banda de alto peso molecular sin señales de degradación. Indicando que el ADN extraído tiene un alto nivel de integridad. En el resto de los protocolos analizados se obtuvieron resultados no satisfactorios, observando barridos o bandas no definidas, señal de que el ADN está fragmentado, por lo tanto, no es apto para trabajos moleculares.

En la tabla 2 se encuentran recaudados los datos de pureza (A260/280) y concentración (ng/μL). En donde se considera el siguiente parámetro; valores entre 1.8-2.0 ± 0.2 se considera un ADN de pureza óptima y eficiente para la técnica de PCR. Fuera de este rango, se consideran que valores < 1.6 indican posibles contaminaciones por fenoles y proteínas y valores > 2.1 indican presencia de ARN en la muestra (Doyle J., 1991).

Realizando una comparación entre el método rápido (protocolo 5) y el método tradicional (protocolo 8), la pureza obtenida mediante el método rápido (protocolo 5) para muestras de hoja y raíz se encuentra entre 1.6, la cual entra en el rango de pureza aceptable para el método, mientras que para muestras de tallo la pureza suele ser menor al rango óptimo, sin embargo, es una pureza aceptable para la identificación de patógenos.

Con respecto a la concentración, en el protocolo 5 se obtienen datos entre los 300 y 200 ng/μL, lo doble comparado con el método control (protocolo 8), siendo una ventaja para el método rápido al tener una mayor disponibilidad del ADN y por consiguiente una mayor cantidad de ADN del patógeno que se quiere identificar. En cuanto al resto de los protocolos, su concentración y pureza son variables, pero la falta de integridad del ADN, hace que este no sea útil para trabajos moleculares.

**Tabla 2.** Concentración y pureza promedio de 3 repeticiones, del ADN extraído de hoja (H), tallo (T) y raíz (R).

Protocolo	Muestra					
	H		T		R	
	(ng/μl)	(A260/280)	(ng/μl)	(A260/280)	(ng/μl)	(A260/280)
Tratamiento 1	776.7	3.6	574.2	3.1	493.2	3.2
Tratamiento 2	360.9	1.8	78.3	1.5	55.3	1.5
Tratamiento 3	536.2	1.9	187	2.2	346.2	2.3
Tratamiento 4	577.9	1.7	326.4	1.4	182.4	1.4
Tratamiento 5	327.1	1.7	227.8	1.3	246.8	1.6
Tratamiento 6	1785.2	1.4	314.7	1.42	469.3	1.4
Tratamiento 7	133.6	2.2	316.3	1.5	94.4	1.5
Tratamiento 8	166.4	4.5	94.8	2.3	96.6	2.5

Comprobación de la extracción por medio de PCR utilizando 26S.



En la figura 2 se muestran los productos de PCR, con el gen ribosomal constitutivo 26S, se observaron los fragmentos esperados de 200 pb. La presencia de este fragmento solo se obtuvo en el protocolo 5 en la planta 1 en hoja, tallo y raíz, en la planta 2 en hoja y en la planta 3 en hoja y tallo. En el protocolo 8 en la planta 2 y planta 3 en hoja. Esto es entendible, ya que en las hojas es mayor el número de células que se usan en la muestra, por consiguiente, se encuentra mayor cantidad de ADN disponible. La ausencia de fragmentos amplificados se relaciona con la baja pureza obtenida de esas muestras y posibles errores humanos durante la extracción.

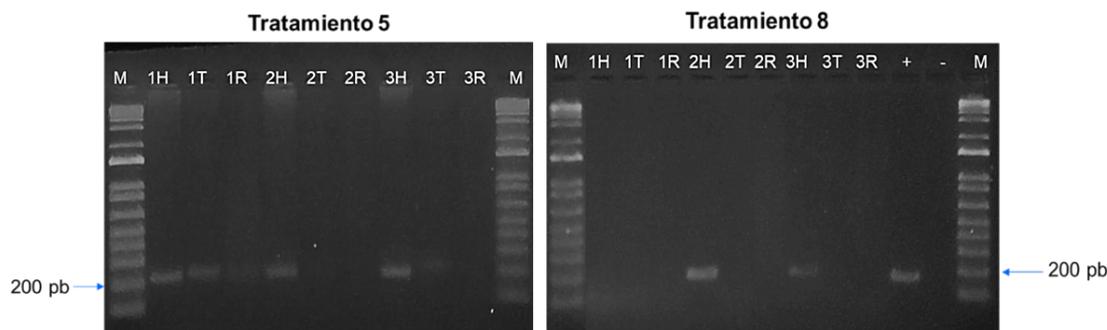


Figura 2. Productos de PCR con el oligo constitutivo 26s. M: marcador de peso molecular 1Kb plus. 1H: planta 1 muestra tomada de hoja. 1T: planta 1 muestra tomada de tallo. 1R: planta 1 muestra tomada de raíz. 2H: planta 2 muestra tomada de hoja. 2T: planta 2 muestra tomada de tallo. 2R: planta 2 muestra tomada de raíz. 3H: planta 3 muestra tomada de hoja. 3T: planta 3 muestra tomada de tallo. 3R: planta 3 muestra tomada de raíz. Fuente: Elaboración propia.

Se demostró la eficiencia del protocolo 5, con la obtención de un ADN extraído de buena calidad para la reacción de PCR, resultado que coincide con lo reportado por Gilliespie et al. (1999), quienes hicieron uso del buffer de PCR 10x para la extracción de ADN a partir de sangre de vacas Jersey, obteniendo buenos resultados en su trabajo. Buscando aumentar la pureza, se adicionó el uso de la proteinasa K en el protocolo de extracción de ADN, ya que se ha demostrado que esta enzima favorece la extracción de ADN puro, inactivando nucleasas que degradan el ADN y removiendo contaminaciones como proteínas de ácidos nucleicos (González et al., 2011).

*Estandarización del método de PCR para la identificación individual de Fusarium spp, Phytophthora capsici y Rhizoctonia solani en plantas de Chile*

Al amplificar el ADN para la identificación de *Fusarium* spp se esperaba un tamaño de fragmento amplificado de 398 pb, el cual concuerda con el carril +F que es el control; sin embargo, en el carril F2 se obtuvo una amplificación de un tamaño de 470 pb, más de 70 pb de diferencia a lo esperado. En la identificación de *Phytophthora capsici* se espera un tamaño de fragmento amplificado de 560 pb, en el carril +P se obtuvo una amplificación de un tamaño de 500 pb, correspondiente al control, teniendo una diferencia al tamaño de fragmento esperado, pero en el carril P1 y carril P3 se obtuvieron amplificaciones de un tamaño de 560 pb que corresponde al fragmento esperado y en el carril P2 una amplificación de 520 pb. En la identificación de *Rhizoctonia solani* se espera un tamaño de fragmento amplificado de 450 pb, en el carril +R se obtuvo una amplificación de 420 pb, correspondiente al control, teniendo una pequeña diferencia al tamaño esperado, en el carril R2 y el carril R3 se obtuvo un fragmento amplificado de 500 pb, 50 pb de diferencia al tamaño esperado (figura 3).

Notando que en los productos amplificados a partir de extracciones de plantas se obtienen amplificaciones con mayor tamaño al control, se realizó una comprobación con plantas libres de patógenos para la comprobación de hibridaciones inespecíficas, donde se obtuvo que en ninguna de las muestras analizadas amplificó para ningún patógeno. Mostrando la especificidad de los pares de oligos usados para la detección.

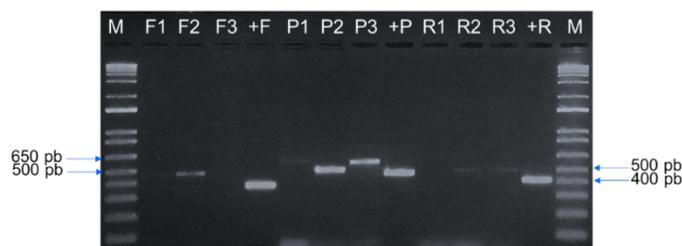


Figura 3. Identificación de *Fusarium* spp, *Phytophthora capsici* y *Rhizoctonia solani* por separado en plantas de Chile. M: marcador de peso molecular 1Kb plus. F1: identificación de *Fusarium* spp en hoja. F2: identificación de *Fusarium* spp en tallo. F3: identificación de *Fusarium* spp en raíz. +F: identificación de *Fusarium* spp a partir del micelio del hongo. P1: identificación de *Phytophthora capsici* en hoja. P2: identificación de *Phytophthora capsici* en tallo. P3: identificación de *Phytophthora capsici* en raíz. +P: identificación de *Phytophthora capsici* a partir del micelio del hongo. R1: identificación de *Rhizoctonia solani* en hoja. R2: identificación de *Rhizoctonia solani* en tallo. R3: identificación de *Rhizoctonia solani* en raíz. +R: identificación de *Rhizoctonia solani* a partir del micelio del hongo. Fuente: Elaboración propia.

En diversos artículos se reportaron diferencias en los tamaños del amplificado con los Oligos ITS-Fu-F y ITS-Fu-R con respecto al artículo original por Abd Elsalam et al. (2003), Robles Hernández et al. (2016) reporta amplificaciones de 400 pb y Córdoba Albores et al. (2014) reportó amplificaciones de 410 pb hasta 429 pb. Siendo nuestros resultados parecidos a los reportados por Córdoba.

Con respecto a la diferencia de tamaños amplificados con el par de oligos PC-1 y PC-2 no se encontró sustento con algún otro trabajo con resultados parecidos a los nuestros, por lo cual se seguirá evaluando su funcionamiento y especificidad.

No se ha encontrado un trabajo en el que evalúen el uso de los iniciadores RhFP y RhP diseñados por Crespo Muñoz (2013). Solo queda hacer pruebas con estos iniciadores capaces de identificar el grupo de anastomosis al que pertenecen los aislados de *Rhizoctonia solani*, siendo una herramienta útil para poder generar un método de control de acuerdo con el grupo de anastomosis al que pertenecen, beneficiando al productor.

Monreal Vargas en el 2005, en su tesis reporta la identificación de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium* spp, en un mismo ensayo a partir de plantas de Chile adultas recolectadas de campo con síntomas característicos de estos dos patógenos, haciendo uso de los oligos TS1-ITS4, donde la extracción de ADN se realizó de raíz con el método CTAB. Con estos oligos, aunque se puede detectar cualquier patógeno, ya que se trata de oligos universales, no se permite diferenciar aquellos productos que tengan un tamaño similar, por lo cual es necesario comprobar la presencia de estos patógenos con otra técnica de diagnóstico. En el presente trabajo, es posible la identificación de los patógenos *Phytophthora capsici* y *Rhizoctonia solani* de manera segura y específica, ya que se trabaja con oligos específicos para cada patógeno, asegurando su fiabilidad sin el uso de otra técnica de diagnóstico.

#### Validación de la técnica de diagnóstico rápido en plantas de Chile con marchitez provenientes de parcelas de agricultores.

En la Figura 4 se observan los productos de PCR, de acuerdo con el carril 1 se confirma la presencia de *Fusarium* spp con un fragmento amplificado de 470 pb, en el carril 3 se confirma la presencia de *Phytophthora capsici* con un tamaño de fragmento amplificado de 650 pb aproximado, el carril 4 corresponde al control positivo de *Fusarium* spp con un fragmento amplificado de 400 pb, el carril 5 corresponde al control positivo de *Phytophthora capsici* con un fragmento amplificado de 560 pb.

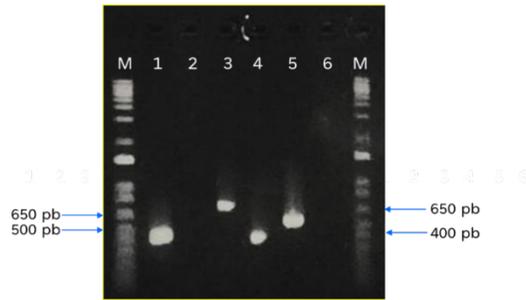


Figura 4. Identificación de *Fusarium* spp y *Phytophthora capsici* en plantas de campo. M: marcador de peso molecular 1Kb. Carril 1: Identificación de *Fusarium* spp en HV. Carril 2: Identificación de *Fusarium oxysporum* en HV. Carril 3: Identificación de *Phytophthora capsici* en HV. Carril 4: identificación de *Fusarium* spp a partir del micelio del hongo. Carril 5: identificación de *Phytophthora capsici* a partir del micelio del hongo. Carril 6: Agua. Fuente: Elaboración propia.

En la tabla 3 se recaudaron los datos de concentración y pureza tomados de las muestras provenientes de parcelas de agricultores. La pureza obtenida mediante el método rápido (Protocolo 5) es de 1.66, mientras que la pureza obtenida con el uso del método tradicional (protocolo 8) es de 1.85, siendo mayor la pureza obtenida mediante el método tradicional, sin embargo, hay que recordar que se trata de un método rápido de extracción de ADN, en el que se discriminan pasos clave para la extracción y purificación del ADN, de una manera eficiente y funcional para la amplificación por PCR. La concentración del ADN extraído mediante el método rápido es de 2097 ng/μL, lo doble comparado con el método tradicional, siendo una ventaja para el método rápido al tener una mayor disponibilidad del ADN y por consiguiente una mayor cantidad de ADN del patógeno que se quiere identificar.

**Tabla 3.** Concentración y pureza del ADN extraído de plantas adultas de parcelas de agricultores, mediante el método rápido (Tratamiento 5) y el método tradicional (Tratamiento 8).

Protocolo	Concentración ng/μL	Pureza (A260/280)
Método rápido	2097	1.66
Método tradicional	910.1	1.85

Se tomaron los tiempos de todo el proceso de identificación, desde la preparación de la muestra, la extracción de ADN hasta la identificación de los patógenos, donde se encontró que el tiempo de la obtención del resultado es de siete horas. Comparado con el método tradicional, con el uso de técnicas de biología molecular se requieren por lo menos 2 días para su identificación, y mediante identificación taxonómica, sembrando el tejido vegetal en medio de cultivo se requieren de 4 a 5 días para su identificación de acuerdo con Velásquez et al., 2000. Reduciendo casi el 50% del tiempo con este nuevo protocolo.

Se han diseñado kits de identificación de patógenos, los cuales pueden dar resultados en menos de 10 minutos, siendo una alternativa para los productores, sin embargo, estos no tienen un precio accesible, además de que no son específicos, por lo cual, requieren su confirmación mediante pruebas en laboratorio (Kits de Diagnóstico Rápido de Enfermedades de las Plantas, s. f.).

Se realizó un análisis de costos, entre el método rápido propuesto, el método tradicional y el método de identificación taxonómica, el método de identificación rápido propuesto es casi 50% más barato que con el uso del método de identificación tradicional. Mientras que, con el uso de herramientas taxonómicas resulta ser 25% más barato que el método de identificación rápido propuesto, siendo más económico, pero también más tardado para la identificación.

Es necesario seguir trabajando con este nuevo protocolo rápido con distintos cultivos que sean afectados por los patógenos de raíz, además de seguir evaluando su funcionamiento y adaptabilidad.

## Conclusión

Dentro de la identificación molecular es muy importante contar con ADN de buena calidad y cantidad disponible, considerando que la extracción de ADN de material vegetal suele ser complicada gracias a algunos compuestos que interfieren en el proceso de extracción y amplificación, por lo tanto, el método de extracción tiene que ser eficiente para la obtención de un ADN libre de contaminantes y con la mayor pureza posible. Con base a esto se estandarizó un método de extracción de ADN total rápido, económico y eficiente para la identificación de patógenos de raíz en plantas de Chile. Logrando reducir el tiempo de extracción de ADN a 2 horas, siendo la mitad del tiempo por el cual se realiza tradicionalmente.

Se estandarizó el método de PCR para la identificación simultánea de los tres patógenos mayormente encontrados en plantas de Chile con síntomas de marchitez de Chile, con el uso de los cebadores ITS-Fu-F y ITS-Fu-R para la identificación del género *Fusarium*, los cebadores PC-1 y PC-2 para la identificación de *Phytophthora capsici* y los cebadores RhP y ITS1 para aislados patogénicos de los grupos de anastomosis AG4 y AG1 y RhFP y ITS1 para aislados patogénicos del grupo de anastomosis AG4 para la identificación de *Rhizoctonia solani*. Se observó una tendencia al aumento de pb del amplificado a partir de las extracciones de plantas, donde se comprobó la especificidad de los cebadores, amplificando ADN extraído de plantas libres de patógenos. Como perspectiva se tiene que secuenciar estos fragmentos y comparar las secuencias con la base de datos para así validar la especificidad de estos oligos.

El tiempo total de identificación de los tres patógenos es de 7 horas usando el método de identificación rápido, este protocolo puede ser una buena propuesta de diagnóstico para la pronta detección de patógenos que puedan causar alguna enfermedad al cultivo agrícola, pudiendo ser identificados en un día.

El método de identificación rápido propuesto es casi 50% más barato que con el uso del método de identificación tradicional, estos haciendo uso de técnicas moleculares. Mientras que con el uso de herramientas taxonómicas resulta ser 25% más barato, sin embargo, para la identificación taxonómica se requieren por lo menos 5 días para la identificación.

## Agradecimientos

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) por brindar el recurso para la realización de este proyecto, cuyo nombre fue: **Desarrollo y transferencia de tecnologías sustentables para la producción de Chile y jitomate en campo e invernadero**, con número de SIGI: 167834791, a los investigadores que laboran en esta institución, la MC. Brenda Zulema, el Dr. Mario Chavira y el Dr. José Luis Pons por su colaboración y, por último, a la Universidad de Guanajuato por brindarme el espacio para la presentación de este proyecto.

## Bibliografía/Referencias

- Abd -Elsalam, K. A., Aly, I. N., Abdel -Satar, M. A., Khalil, M. S., & Verreet, J. A. (2003). PCR identification of *Fusarium* genus based on nuclear ribosomal-DNA sequence data. *African Journal of Biotechnology*, 2(4), 82-85. <https://doi.org/10.5897/ajb2003.000-1016>
- Acevedo Bedoya, F. E., Navarro Escalante, L., Constantino Chuaire, L. M., Gil Palacio, Z. N., y Benavides Machado, P. (2007). Método rápido y económico para la extracción de ADN genómico en la broca del café y su uso en PCR. *Cenicafé*, 58(2), 134-141. [https://biblioteca.cenicafe.org/bitstream/10778/142/1/arc058\(02\)134-141.pdf](https://biblioteca.cenicafe.org/bitstream/10778/142/1/arc058(02)134-141.pdf)
- Ajayi-Oyetunde, O. O., & Bradley, C. A. (2017). *Rhizoctonia solani*: taxonomy, population biology and management of rhizoctonia seedling disease of soybean. *Plant Pathology*, 67(1), 3-17. <https://doi.org/10.1111/ppa.12733>
- Baenas, N., Belović, M., Ilic, N., Moreno, D. A., & García Viguera, C. (2019). Industrial use of pepper (*Capsicum annuum* L.) derived products: Technological benefits and biological advantages. *Food Chemistry*, 274, 872-885. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.047>
- Barnes, L. W. (1994). THE ROLE OF PLANT CLINICS IN DISEASE DIAGNOSIS AND EDUCATION: A North American perspective. *Annual Review Of Phytopathology*, 32(1), 601-609. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.32.090194.003125>
- Córdova Albores, L. C., Bautista Baos, S., Martínez Herrera, J., Barrera Necha, L., Hernández López, M., & Cruz Hernández, A. (s. f.). Morphological and molecular characterization of pathogenic isolates of

- Fusarium spp. obtained from gladiolus corms and their sensitivity to *Jatropha curcas* L. oil. African Journal Of Microbiology Research, 8(8), 724-733. <https://doi.org/10.5897/ajmr2013.6413>
- Crespo Muñoz, S. (2013). Establecimiento de una metodología para la detección molecular de *Rhizoctonia solani* causante de pudrición de raíz en frijol común. Biblioteca Digital Universidad del Valle. <https://hdl.handle.net/10893/24104>
- De la Cruz-Ricardez, D., Ortiz-García, C. F., Del C Lagunes-Espinoza, L., & La Cruz, M. T. (2020). EFECTO ANTIFÚNGICO in vitro DE EXTRACTOS METANÓLICOS DE *Capsicum* spp. EN *Moniliophthora roreri*. Agrociencia, 54(6), 813-824. <https://doi.org/10.47163/agrociencia.v54i6.2186>
- Doyle, J. (1991). DNA Protocols for Plants. En Springer eBooks (pp. 283-293). [https://doi.org/10.1007/978-3-642-83962-7\\_18](https://doi.org/10.1007/978-3-642-83962-7_18)
- Dũng, L., Diên, N. T., Đại, P. H., & Tuân, P. N. (2016). THE FIRST REPORT OF PESTALOTIOPSIS SP. CAUSING CROWN ROT DISEASE ON STRAWBERRIES IN DALAT. Dalat University Journal of Science, 6(3), 364-376. [https://doi.org/10.37569/DalatUniversity.6.3.81\(2016\)](https://doi.org/10.37569/DalatUniversity.6.3.81(2016))
- Fernández-Pavía, S. P., Díaz-Celaya, M., & Rodríguez-Alvarado, G. (2013). *Phytophthora* in México. En CABI eBooks (pp. 215-221). <https://doi.org/10.1079/9781780640938.0215>
- Gilliespie, B., Jayarao, B., Dowlen, H., & Oliver, S. (1999). Analysis and Frequency of Bovine Lymphocyte Antigen DRB3.2 Alleles in Jersey Cows. Journal Of Dairy Science, 82(9), 2049-2053. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(99\)75443-3](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(99)75443-3)
- González N, Rodríguez N, Torres W, O'Callaghan J & De Jesús R. (2011). A Simple Protocol for Molecular Analysis with DNA Extrated from Ear Tissue of Laboratory Animals: Mouse and Rat, Using Bromelina Enzyme. Revista Científica, 21 (3), 233-238. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=95918239007>
- Laborde Cancino, J. A., Pozo Campodónico, O., & Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. (1984). Presente y pasado del Chile en México. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas.
- Lau, N. R., Lara, F. M., & Estévez, M. M. (2011). El Chile habanero: su origen y usos. Ciencia - Academia Mexicana de Ciencias, 62(3), 70-78. [https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/62\\_3/PDF/Habanero.pdf](https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/62_3/PDF/Habanero.pdf)
- Moctezuma Bautista, K., Ortiz García, C. F., Palma López, D. J., Cerón Hernández, L. A., Fernández Pavía, S. P., Rodríguez Alvarado, G., & Landero Valenzuela, N. (2021). Etiología de la marchitez del Chile habanero (*Capsicum chinense*) en Tabasco, México. Revista mexicana de fitopatología, 39(3), 503-514. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2103-5>
- Monreal Vargas, C. T. (2005). Desarrollo de métodos de diagnóstico molecular de enfermedades virales, bacterianas y fúngicas en hortalizas [Tesis de Maestría, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.]. <https://repositorio.ipicyt.edu.mx/bitstream/handle/11627/187/MonrealVargas.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Montero Tavera, V., Escobedo Landín, M. A., Acosta Gallegos, J. A., Anaya Lopez, J. L., & Ruiz Nieto, J. E. (2017). 26S: Novel reference gene from leaves and roots of common bean for biotic stress expression studies based on PCR. Legume Research - An International Journal, 40(3), 429-433. <https://doi.org/10.18805/lr.v0i0f.7859>
- PROGRAMA DE CONTROL DE CALIDAD DE MUESTRAS DE ADN y ARN. (2020, octubre). Banco Nacional de ADN Carlos III (Universidad de Salamanca). <https://www.bancoadn.org>
- Quispe Quispe, E., Moreira Morrillo, A. A., & Garcés Fiallos, F. R. (2022). Una revisión sobre biocontroladores de *Phytophthora capsici* y su impacto en plantas de *Capsicum*: Una perspectiva desde el exterior al interior de la planta. Scientia Agropecuaria, 13(3), 275-289. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2022.025>
- Rico Guerrero, L., Medina Ramos, S., Muñoz Sánchez, C. I., Guevara Olvera, L., Guevara González, R. G., Guerrero Aguilar, B. Z., Torres Pacheco, I., Rodríguez Guerra, R., & González Chavira, M. M. (2004). Detección de *Phytophthora capsici* Leonian en Plantas de Chile (*Capsicum annuum* L.) mediante PCR. Revista Mexicana de Fitopatología, 22(1), 1-6. <http://www.redalyc.org/pdf/612/61222101.pdf>
- Rico Guerrero, L., Medina Ramos, S., Muñoz Sánchez, C. I., Guevara Olvera, L., Guevara González, R. G., Guerrero Aguilar, B. Z., Torres Pacheco, I., Rodríguez Guerra, R., & González Chavira, M. M. (2004). Detección de *Phytophthora capsici* Leonian en Plantas de Chile (*Capsicum annuum* L.) mediante PCR. Revista Mexicana de Fitopatología, 22(1), 1-6. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61222101>



- Tegli, S., Sereni, A., & Surico, G. (2002). PCR-based assay for the detection of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in bean seeds. *Letters In Applied Microbiology*, 35(4), 331-337. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2002.01187.x>
- Vásquez López, A., Tlapal Bolaños, B., De Jesús Yáñez Morales, M., Pérez Pacheco, R., & Quintos Escalante, M. (2009). ETIOLOGÍA DE LA MARCHITEZ DEL 'CHILE DE AGUA' (*Capsicum annuum* L.) EN OAXACA, MÉXICO. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 32(2), 127-134. <https://doi.org/10.35196/rfm.2009.2.127-134>
- Velásquez Valle, R., Medina Aguilar, M. M., & Luna Ruiz, J. D. J. (2001). Sintomatología y Géneros de Patógenos Asociados con las Pudriciones de la Raíz del Chile (*Capsicum annuum* L.) en el Norte-Centro de México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 19(2), 175-181. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61219207>
- Velásquez Valle, R., Reveles Torres, L. R., & Reveles Hernández, M. (2013). Manejo de las principales enfermedades del chile para secado en el norte centro de México. En *Campo Experimental Zacatecas. CIRNOC – INIFAP* (ISBN: 978-607-37-0133-4). <http://zacatecas.inifap.gob.mx/publicaciones/EnfChilS.pdf>
- Zapata Vázquez, A., Sánchez Sánchez, M., Del Río Robledo, A., Silos Espino, H., Perales Segovia, C., Flores Benítez, S., González Chavira, M. M., & Valera Montero, L. L. (2012). *Phytophthora capsici* epidemic dispersion on commercial pepper fields in Aguascalientes, Mexico. *TheScientificWorldJournal*, 2012, 341764. <https://doi.org/10.1100/2012/341764>
- Zhang, Z. G., Li, Y. Q., Fan, H., Wang, Y. C., & Zheng, X. B. (2006). Molecular detection of *Phytophthora capsici* in infected plant tissues, soil and water. *Plant Pathology*, 55(6), 770-775. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01442.x>
- Robles-Hernández, L., Gómez-Franco, A. C., Gill-Langarica, E. M., Pérez-Moreno, L., & López-Díaz, J. C. (2020). Virus fitopatógenos que afectan al cultivo de chile en México y análisis de las técnicas de detección: Plant pathogenic viruses that affect pepper in México and analysis of the detection techniques. *TECNOCENCIA Chihuahua*, 4(2), 72-86. <https://doi.org/10.54167/tch.v4i2.715>

