

Identificación y caracterización molecular del hongo causante de la pudrición blanca en *Allium cepa*, en Llano Grande de Cartago, Costa Rica

Isolation and identification of causal agent of white rot in *Allium cepa*, in Llano Grande Cartago, Costa Rica

Wendy Aguilar-Ulloa¹, Priscilla Arce-Acuña², William Rivera-Méndez³

Fecha de recepción: 27 de marzo del 2015
Fecha de aprobación: 6 de agosto del 2015

Aguilar-Ulloa, W; Arce-Acuña, P; Rivera-Méndez.
Identificación y caracterización molecular del hongo causante de la pudrición blanca en *Allium cepa*, en Llano Grande de Cartago, Costa Rica. *Tecnología en Marcha*. Edición Especial Biocontrol. Pág 51-56.

1 Ingeniera en Biotecnología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Tel. 63065604, correo electrónico: waguilar@estudiantec.cr

2 Ingeniera en Biotecnología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Tel. 6052-0515, correo electrónico: priarce.30@gmail.com

3 Profesor de la Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Correo electrónico: wirivera@itcr.ac.cr



Palabras clave

Sclerotinia sclerotiorum; pudrición blanca; cebolla.

Resumen

La cebolla (*Allium cepa* L.) es un cultivo de importancia de Costa Rica, tanto para el consumo nacional como internacional. En este cultivo se presentan pérdidas económicas debido a enfermedades producidas por patógenos como la pudrición blanca, que afecta directamente el bulbo y representa una gran amenaza para la agricultura, por tener la capacidad de perdurar hasta 20 años en el suelo. El objetivo general de esta investigación consistió en hacer el diagnóstico microbiológico y molecular de un patógeno causante de pudrición blanca en cebolla cultivada en Varillal de Llano Grande, en la provincia de Cartago, Costa Rica, mediante el aislamiento y cultivo de esclerocios. Con esta metodología se logró el aislamiento e identificación del patógeno causante de la pudrición blanca en la cebolla y se determinó que, de manera microscópica, es similar a *Stromatinia cepivorum* ya que desarrolla esclerocios y presenta hifas con estructuras en forma de *clamps*, sin embargo, mediante el análisis molecular se logró identificar como *Sclerotinia sclerotiorum*, otro patógeno causante de esta enfermedad.

Keywords

Sclerotinia sclerotiorum; white rot; onion.

Abstract

Onion (*Allium cepa* L.) is a very important crop in Costa Rica in national consume but also international. With this crop, it has been estimated economic loses because of diseases produced by different pathogens like the white rot, which generate illness directly in the bulb and it represents a great threat for the agriculture, because it can stay 20 years in the ground. Therefore, the general objective of this research was to develop a microscopic and molecular diagnosis of the pathogen that causes the white rot in the onion cultivated in Varillal de Llano Grande in Cartago, from sclerotic isolation and culture. The followed methodology allowed us to isolate and identify the causal agent of this illness, the one in a microscopic manner it was similar to *Stromatinia cepivorum*, however it was able to identify as *Sclerotinia sclerotiorum* by molecular analysis.

Introducción

La cebolla (*Allium cepa* L.) es uno de los cultivos más importantes de Costa Rica. Su producción satisface el consumo nacional y un porcentaje se destina a la exportación. La producción de este cultivo se concentra principalmente en la zona alta de la provincia de Cartago, en los cantones Central, Oreamuno y Alvarado, donde se ubican cerca del 79% de los productores, mientras que el porcentaje restante se distribuye entre las zonas de Santa Ana, Alajuela, Belén y Bagaces (Granados, 2005).

En Costa Rica, se estiman pérdidas económicas que rondan el 39% de la producción del primer ciclo de cultivo de la cebolla debido a la enfermedad fúngica conocida como pudrición blanca, que genera afecciones directamente en el bulbo. Esto hace que el control de esta enfermedad sea de vital importancia a nivel comercial (Granados & Wang, 2008; Rojas et al., 2010).

El cultivo de la cebolla se ve afectado por diversos patógenos causantes de pudriciones radicales, entre los que destacan *Fusarium oxysporum* f. sp. cepa, *Sclerotium cepivorum*, *Pyrenochaeta terrestris* y *Pythium* spp. (Herrera et al., 2012). Se ha reportado que la pudrición blanca en cebolla es inducida principalmente por el hongo *Sclerotium cepivorum* Berk, específico del género *Allium* y perteneciente al orden Mycelia sterilia (Herrera et al., 2008; Velásquez et al., 2011; Cortez, 2014).

Sin embargo, en otras hortalizas como lechuga, coliflor, repollo, cebolla, calabacín, apio, entre otras, se ha determinado que la pudrición blanca puede ser producida por otros hongos patógenos como *Sclerotinia sclerotiorum* y *S. minor* que son microorganismos capaces de formar esclerocios y desarrollar síntomas similares a los producidos por *S. cepivorum* (Granados, 2005; Pérez et al., 2009).

La particularidad de estos patógenos es que pueden persistir en el suelo hasta por 20 años, con un viabilidad promedio del 90%, gracias a la formación de estructuras resistentes llamadas esclerocios, que son además las estructuras reproductivas que funcionan como inóculo, tal es el caso del hongo *Sclerotinia sclerotiorum* (Granados, 2005).

S. sclerotiorum pertenece al filo Ascomycota, comúnmente habita el suelo, está distribuido mundialmente y afecta alrededor de 360 especies de plantas cultivadas, causando la enfermedad conocida como pudrición blanca o moho blanco (Smith, 2007).

Para la agricultura, esta enfermedad representa una gran amenaza, ya que prácticas como la rotación de cultivos no resultan eficaces, no existen variedades resistentes y el combate químico no es factible económicamente, porque se necesitan dosis muy altas que no aseguran una adecuada cobertura de los sitios de infección (Velásquez et al., 2011). Ante esta problemática, ha sido muy importante el apoyo al sector agrícola y el desarrollo de investigaciones con el fin de tener un mayor conocimiento de los agentes causales.

Con el fin de emplear estrategias más eficientes para la identificación, se han desarrollado diferentes investigaciones, como en el caso de *S. cepivorum*, mediante la detección molecular, amplificando las regiones ITS del hongo, lo que ha cobrado mayor importancia ya que representa una técnica más eficiente, específica y sencilla para su identificación tanto en muestras de plantas como de suelo (Cortez, 2014).

El objetivo de esta investigación se enfoca en el aislamiento e identificación del agente causante de la pudrición blanca en muestras de cebolla de la zona de Llano Grande, Cartago, mediante técnicas microbiológicas y el diagnóstico molecular.

Materiales y métodos

Localización y material experimental

Se tomaron muestras de cebollas que presentaron micelio de coloración blanca y esclerocios adheridos en la zona radical, en una finca ubicada en la zona de Varillal de Llano Grande, a 1850 metros sobre el nivel del mar (msnm). Las pruebas y procedimientos se llevaron a cabo en los laboratorios de la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Aislamiento de los esclerocios

Los esclerocios fueron retirados de las cebollas cuidadosamente y se colocaron sobre una toalla de papel, luego se realizó un proceso de desinfección con hipoclorito de sodio al 3% durante 30 segundos, 1 minuto en alcohol al 70% y 2 minutos en agua destilada estéril. Se tomaron grupos de 10 esclerocios, se cultivaron en placas de Petri con medio de cultivo PDA acidificado y se

incubaron durante siete días a 30 °C. Posteriormente, se seleccionaron esclerocios germinados y se transfirieron a placas de PDA acidificado y se incubaron a 30 °C durante 10 días.

Identificación microscópica

Para la identificación microscópica se tomó un segmento del micelio de los esclerocios germinados, se colocó en un portaobjetos con una gota de azul de lactofenol y se observó en el microscopio hasta un aumento de 100X. Los esclerocios formados en la placa de medio de cultivo se observaron en el estereoscopio.

Análisis molecular

Extracción de ADN

Se utilizó el kit Power Soil® DNA Isolation y se siguió el protocolo establecido por el fabricante. Se realizó una variante en el proceso de lisis, para lo cual las muestras se calentaron sin aditivo 1, posteriormente se adicionó a cada muestra el volumen de aditivo 1 y se procedió a realizar el proceso de calentado.

Amplificación del ADN

Se utilizaron las siguientes mezclas de reactivos para realizar la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de cada muestra: 30,7µl de agua para PCR, 5 µl de Buffer Dream Taq 10X, 5µl dNTPs (2mM), 2µl de cada *primer* (10µM), 0,3 µl de Dream Taq polimerasa (5U/µl) y 5µl de la muestra. El volumen total de la reacción fue 50µl. Se utilizó el perfil térmico para *primers* universales del dominio Eukarya descrito por Gutiérrez et al. (2010). Se utilizaron los *primers* GC-FUNG y NS1 y agua destilada como control negativo. Los fragmentos de ADN amplificados se analizaron mediante secuenciación y se analizó la información obtenida con el propósito de encontrar diferencias o similitudes entre las muestras.

Resultados y discusión

Aislamiento e identificación de estructuras

El cultivo de los esclerocios del bulbo de la cebolla permitió el aislamiento del hongo *Sclerotinia sclerotiorum*, ya que el esclerocio produce micelio y el desarrollo de abundantes estructuras reproductivas (figura 1).



Figura 1. Aislamiento de *Sclerotinia sclerotiorum* en medio de cultivo PDA mediante el cultivo de esclerocios extraídos de muestras de cebolla.

En la plantación de cebolla muestreada en Llano Grande de Cartago fue posible observar los diferentes síntomas característicos del desarrollo de la enfermedad. Entre estos se destacan primeramente el amarillamiento general de la planta, sobre todo cuando se inicia el proceso de bulbificación, así como la muerte descendente de las hojas externas, la aparición de una pudrición basal seca o ligeramente acuosa, paralelamente en las hojas inferiores y en las raíces la acumulación de micelio blanco y lanoso que produce esclerocios negros esféricos tanto en la superficie como de manera interna en los tejidos enfermos y que culmina con la pudrición completa del bulbo (figura 2). La enfermedad se desarrolla a una temperatura de 16-20 °C y una humedad relativa menor al 90%, principalmente en suelos con alta humedad, ya que este es un factor de predisposición que favorece el desarrollo de la infección (Carranza, 2006).

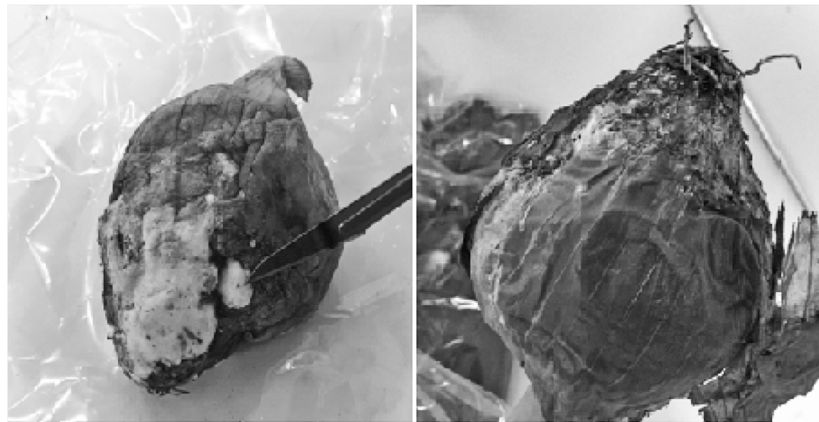


Figura 2. Bulbos infectados de la Finca en Varillal de Llano Grande.

El micelio blanco algodonoso con presencia de esclerocios oscuros de tamaño reducido obtenidos tras el cultivo de los esclerocios aislados del bulbo es característico de *S. sclerotiorum*. Según Pérez et al. (2009), una particularidad importante es el tamaño de los esclerocios, que son más grandes que los de *S. minor*, con un diámetro de entre 2 y 10 mm (figura 3). Las hifas que germinan a partir de esclerocios presentan anastomosis, un fenómeno que permite el intercambio por fusión entre ellas, lo cual lleva a observar la formación de fíbulas o *clamps*, por su nombre en inglés (figura 3).

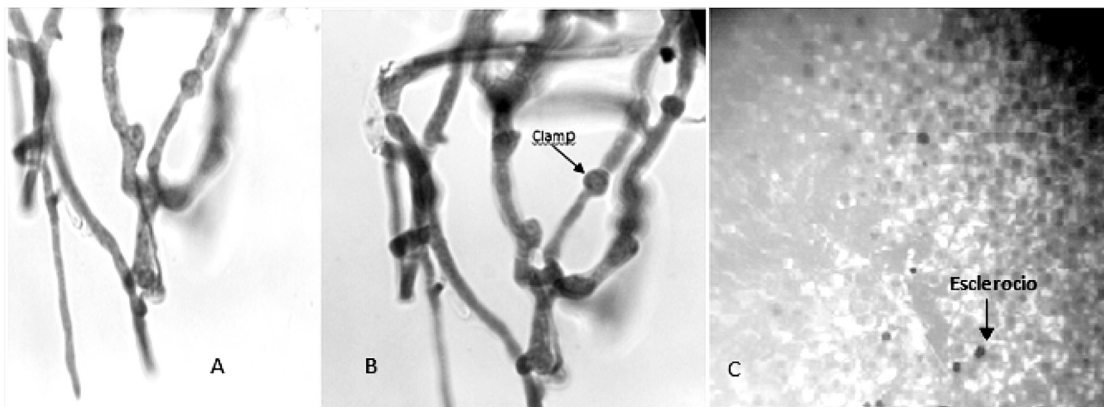


Figura 3. Estructuras vistas en el microscopio. A) Micelio de *S. sclerotiorum*, B) presencia de *clamps* en el micelio (100X), C) esclerocios observados en el estereoscopio.

Tras el análisis de los resultados de la secuenciación mediante herramientas bioinformáticas, se logró determinar que el hongo aislado corresponde a *S. sclerotiorum* con un 99% de identidad, descartando así que el patógeno causante de la pudrición blanca fuera *Sclerotium cepivorum*, que, según Granados (2005), es el patógeno causante de esta enfermedad con mayor incidencia en las zonas altas de Cartago; además, de igual manera, este hongo se caracteriza morfológicamente por un micelio blanco, la formación de esclerocios y *clamps*. A esto se le suma la similitud de la forma de infección en el cultivo y los respectivos síntomas presentes en la planta.

Conclusiones

Se logró aislar el patógeno causante de la pudrición blanca en la cebolla cultivada en Varillal de Llano Grande, el cual de manera microscópica es similar a *Sclerotium cepivorum*, pero que mediante el análisis molecular se logró identificar como *Sclerotinia sclerotiorum*.

Bibliografía

- Carranza, Z. (2006). *Selección e identificación de especies de hongos ectomicorrizógenos del Estado de Hidalgo más competentes en medio de cultivo sólido*. Tesis de grado para optar por el título de Ingeniero Agroindustrial. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.
- Cortez, A. (2014). *Estandarización de una metodología para la detección molecular de Sclerotium cepivorum en suelos, basada en la amplificación de secuencias espaciadoras internas de transcripción (ITS)*. Trabajo de grado para optar por el título de Licenciatura en Biotecnología, Universidad Autónoma de Querétaro, México.
- Granados, M. (2005). Pudrición blanca de la cebolla, una enfermedad difícil de combatir. *Revista Agronomía Costarricense*, 29(2), 143-156.
- Granados, M. & Wang, A. (2008). Efecto de biocontroladores aislados en finca productoras de cebolla sobre la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum*). *Revista Agronomía Costarricense*, 32(1), 9-17.
- Gutiérrez, A., Pantoja, S., Quiñones, R. & González, R. (2010). Primer registro de hongos filamentosos en el ecosistema de surgencia costero frente a Chile central. *Gayana*, 74(1), 66-73.
- Herrera, V., García, R., Rodríguez, M. & Zavaleta, E. (2008). Análisis temporal de la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk.) de la cebolla (*Allium cepa* L.) bajo tres niveles de inóculo del patógeno. *Agrociencia*, 42, 71-83.
- Herrera, A., Zavaleta, E., Cervantes, L. & Grimaldo, O. (2012). Alternativas de control de la pudrición radical de cebolla para el Valle de la Trinidad, Baja California. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(1), 97-112.
- Pérez, S., Piedrahíta, W. & Arbeláez, G. (2009). Patogénesis de la pudrición blanda de la lechuga (*Lactuca sativa* L.) en la Sabana de Bogotá causada por *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary y *Sclerotinia minor* Jagger. Una revisión. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 3(2), 262-274.
- Rojas, V., Ulacio, D., Jiménez, M., Perdomo, W. & Pardo, A. (2010). Análisis epidemiológico y control de *Sclerotium cepivorum* Berk y la pudrición blanca en ajo. *Revista Bioagro*, 22(3), 185-192.
- Smith, A. (2007). *Caracterización, análisis espacial y manejo integrado del moho blanco (Sclerotinia minor Jagger y S. sclerotiorum (Lib.) de Bary) en lechuga bartavia (Lactuca sativa L. var. capitata L.) en la vereda La Moya (Cota-Cumdinamarca)*. Trabajo de grado para optar por el título de microbiología agrícola y veterinario. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Velásquez, R., Reveles, M. & Medina, M. (2011). *Ecología del hongo causante de la pudrición blanca del ajo y cebolla y saneamiento de parcelas infestadas*. Folleto Técnico No. 32. Campo Experimental Zacatecas, CIRNOC-INIFAP.