



INFORME BREVE

Caracterización morfológica y molecular de aislados de *Macrophomina phaseolina* asociados a caña de azúcar en México



Santos G. Leyva-Mir^a, Guadalupe C. Velázquez-Martínez^a, Bertha Tlapal-Bolaños^a, Juan M. Tovar-Pedraza^{b,*}, Greta H. Rosas-Saito^c y Omar G. Alvarado-Gómez^d

^a Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, Estado de México, México

^b Fitopatología, Instituto de Fitosanidad, Colegio de Posgraduados, Texcoco, Estado de México, México

^c Red de Estudios Moleculares Avanzados, Instituto de Ecología, Xalapa, Veracruz, México

^d Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de Los Garza, Nuevo León, México

Recibido el 29 de diciembre de 2014; aceptado el 17 de marzo de 2015

Disponible en Internet el 13 de mayo de 2015

PALABRAS CLAVE

Macrophomina phaseolina;
Saccharum officinarum;
Caracterización morfológica;
Microscopía electrónica de barrido

Resumen La pudrición carbonosa, causada por *Macrophomina phaseolina*, es una enfermedad importante de la caña de azúcar en México. Este estudio se realizó con el objetivo de caracterizar aislados de *M. phaseolina* obtenidos de caña de azúcar mediante análisis morfológicos y moleculares. La caracterización morfológica de 10 aislados se llevó a cabo con el uso de microscopía electrónica de barrido y microscopía de luz. Para confirmar la identificación, se extrajo el ADN de 2 aislados representativos, y la región del espaciador interno transcrito (ITS) se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa y se secuenció usando los iniciadores específicos MpKF1 y MpKR1. Los aislados se identificaron como *M. phaseolina* con base en la morfología. El análisis de secuencias ITS mostró 100% de similitud con las secuencias de *M. phaseolina* depositadas en el GenBank. Para nuestro conocimiento, este es el primer estudio del mundo enfocado a caracterizar aislados de *M. phaseolina* obtenidos de caña de azúcar.

© 2014 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

KEYWORDS

Macrophomina phaseolina;
Saccharum officinarum;
Morphological characterization;

Morphological and molecular characterization of isolates of *Macrophomina phaseolina* associated with sugarcane in Mexico

Abstract Charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina* is an important disease of sugarcane in Mexico. This study was carried out to characterize isolates of *M. phaseolina* obtained from sugarcane by the combination of morphological and molecular analyses. The morphological characterization of 10 isolates was performed using scanning electron microscopy and light

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: jmtovar@colpos.mx (J.M. Tovar-Pedraza).

Scanning electron microscopy

microscopy. To confirm the morphological identification, rDNA from two representative isolates was extracted, and the internal transcribed spacer (ITS) region was amplified by polymerase chain reaction and sequenced using specific primers MpKF1 and MpKR1. Based on their morphological characteristics, all isolates were identified as *M. phaseolina*. Moreover, the analysis of two ITS sequences showed 100% similarity with the *M. phaseolina* sequences deposited in the GenBank. To our knowledge, this is the first study in the world aimed at characterizing isolates of *M. phaseolina* obtained from sugarcane.

© 2014 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Macrophomina phaseolina es un hongo fitopatógeno con origen en el suelo y semilla, perteneciente a la familia Botryosphaeriaceae^{6,11,14}. Este hongo causa enfermedad en más de 500 especies vegetales, incluyendo hospedantes de importancia económica como soya (*Glycine max* L.), frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), papa (*Solanum tuberosum* L.), maíz (*Zea mays* L.), sorgo (*Sorghum bicolor* L.), cacahuate (*Arachis hypogaea* L.), chile (*Capsicum annuum* L.), garbanzo (*Cicer arietinum* L.), algodón (*Gossypium hirsutum* L.) y canola (*Brassica napus* L.)¹⁰. Además, este patógeno se encuentra ampliamente distribuido en áreas cálidas y puede invadir tejidos inmaduros, dañados o senescentes, principalmente cuando las condiciones son cálidas y secas³. En México, este hongo se ha reportado en cultivos como maíz, frijol, sorgo, soya⁹ y caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.)⁸. En este último cultivo, se informó que *M. phaseolina* causó daños graves durante los ciclos 2011 y 2012. En Argentina, este hongo causó importantes pérdidas en cultivos como canola⁷ y fresa⁴. Es importante señalar que dada la abundante producción de microesclerocios negros por parte de *M. phaseolina*, los tejidos con pudrición se aprecian ennegrecidos, por lo cual la enfermedad causada por este hongo es conocida como pudrición carbonosa¹³.

A nivel mundial, se han realizado varios intentos para dividir a los aislados de *M. phaseolina* en subespecies o subgrupos, los que han fracasado debido a la extrema variación intraespecífica en la morfología y la patogenicidad^{5,9}. Asimismo, las frecuentes dificultades para detectar e identificar a este hongo mediante técnicas convencionales basadas en la caracterización morfológica alentó el desarrollo de enfoques moleculares basados en análisis de secuencias de ácidos nucleicos^{1,2}.

El objetivo de este estudio fue caracterizar morfológica y molecularmente a aislados de *M. phaseolina* obtenidos de tejidos de caña de azúcar con síntomas de pudrición carbonosa, cultivada en campos del estado de Veracruz, México.

Durante 2013 se recolectaron plantas de caña de azúcar cv. MX 69-290 con síntomas típicos de pudrición carbonosa en campos localizados en el municipio de Cosamaloapan, Veracruz, México. Las plantas enfermas presentaban pudrición seca de raíz y tallo, así como marchitez y muerte prematura. En plantas con infecciones avanzadas y graves, se detectó la presencia de microesclerocios y picnidios de color negro en la base del tallo.

Para aislar al agente causal, se cortaron 100 fragmentos a partir del tejido localizado en la zona de avance de la pudrición. Los fragmentos se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio al 2% por 3 min, se enjuagaron con

agua destilada estéril y se secaron en papel de filtro estéril. Los fragmentos desinfectados se colocaron en cajas de Petri con medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) (Difco®, EE. UU.) suplementado con 150 µg de sulfato de estreptomina (Sigma-Aldrich®, EE. UU.). Las cajas se incubaron durante 6 días a 30 °C bajo oscuridad continua. Las colonias del hongo aislado con mayor frecuencia se transfirieron a cajas de Petri con medio PDA fresco. Los aislados del hongo se conservaron en un ultracongelador a -80 °C en tubos criogénicos que contenían glicerol al 15%.

La caracterización macroscópica de las colonias de 10 aislados se realizó registrando la coloración y el tipo de crecimiento micelial desarrollado en medio de cultivo PDA bajo incubación a 30 °C en oscuridad continua. La caracterización morfológica microscópica se realizó mediante el registro de la forma y el color de los picnidios, las células conidiogénicas y los conidios, usando un microscopio compuesto a una magnificación de 40×. Asimismo, el sistema de análisis de imágenes Motic Image Plus v. 3.0 (Motic Group®, China) se usó para determinar el tamaño (largo por ancho) de 30 picnidios y 100 conidios.

Con la finalidad de complementar la caracterización morfológica del hongo, se analizaron con microscopía electrónica de barrido (MEB) diversas muestras de las estructuras reproductivas desarrolladas naturalmente en los tallos sintomáticos recolectados. Para ello, con una navaja se realizaron cortes longitudinales de los picnidios presentes en los tejidos infectados. Los cortes se fijaron en glutaraldehído al 2,5% en amortiguador de fosfatos Sorensen's 0,1 M y pH 7,2 durante 12 h, y se lavaron 3 veces seriadas con el amortiguador de fosfatos antes mencionado, 5 min en cada cambio. Las muestras se deshidrataron en una serie de etanoles graduales (30, 40, 50, 60, 70, 80 y 90%), dejando 45 min en cada concentración, y se repitió 3 veces en una concentración de alcohol etílico al 100% por 20 min. Las muestras se secaron con CO₂ en un desecador de punto crítico (Sandri-780A®, EE. UU.), se colocaron sobre un portamuestras usando una cinta de doble adhesión de carbón y se cubrieron con oro en una ionizadora (Ion Sputter JFC-1100, JEOL®, Japón) durante 4 min. Luego se observaron y fotografiaron en un microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM 6390®, Japón) operando a 15 Kv.

La confirmación de la identidad del hongo se realizó mediante la amplificación de la región del espaciador interno transcrito (ITS) del ADN. El ADN total de 2 aislados representativos con 15 días de crecimiento en agar nutritivo se extrajo usando el kit AxyPrep Multi-source Genomic MiniprepMR (Axygen Biosciences®, EE. UU.),

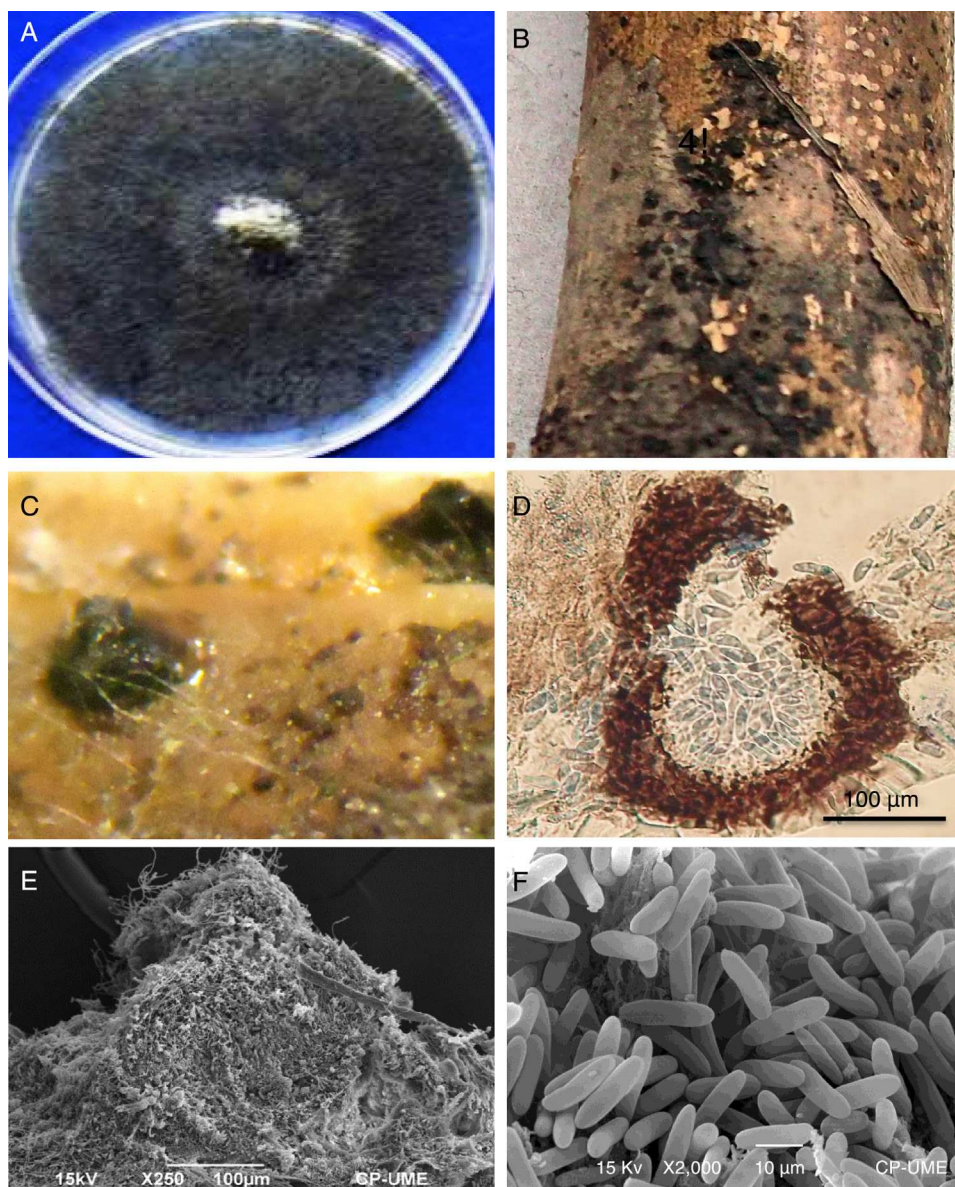


Figura 1 Colonia, estructuras de reproducción y estructuras de resistencia de *Macrophomina phaseolina*. A) Colonia con 8 días de crecimiento en medio de cultivo papa dextrosa agar. B) Microesclerocios irregulares y negros desarrollados en tallo de caña de azúcar. C) Picnidios semiinmersos en tallo de caña de azúcar. D) Corte longitudinal de picnidio con conidios inmaduros en su interior, teñidos con azul de algodón y vistos en microscopia de luz. E) Corte longitudinal de picnidio visto en microscopia electrónica de barrido (MEB). F) Conidios inmaduros vistos en MEB.

siguiendo el procedimiento recomendado por el fabricante. La amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo utilizando los oligonucleótidos MpKF1 (5'-CCGCCAGAGGACTATCAAAC-3') y MpKR1 (5'-CGTCCGAAGCGAGGTGTATT-3'), los cuales son específicos para el hongo *M. phaseolina* y cuyas secuencias amplifican un ITS que genera un producto de 350 pb¹⁻³.

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 µl de la siguiente mezcla: amortiguador de reacción a una concentración 1×2 mM de $MgCl_2$, 200 µM de cada uno de los 4 dNTP, 20 pmoles de cada oligonucleótido, 0,4 unidades de Taq ADN polimerasa (Promega®, EE. UU.) y una cantidad variable de ADN total entre 30 y 70 ng. El programa térmico consistió en una temperatura inicial de 95 °C

durante 5 min, seguido de 25 ciclos a 95-56-72 °C durante 30-60-120 s, respectivamente, y una extensión final durante 10 min a 72 °C. Se utilizó un termociclador PTC-150 (MJ Research®, EE. UU.). Los productos amplificados se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% y las bandas se observaron en un transiluminador de luz ultravioleta (UVP®, EE. UU.).

Los fragmentos amplificados por PCR con los oligos MpKF1 y MpKR1 se secuenciaron directamente en un secuenciador automatizado 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®, EE. UU.) con un kit de reacción de terminadores ABI Prism, y los resultados se compararon con las secuencias disponibles en la base de datos del GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica. Las secuencias obtenidas se

depositaron en la base de datos del GenBank con número de acceso KJ577740 y KJ577741.

Del total de colonias obtenidas a partir de los tejidos sintomáticos sembrados en PDA, el 92% correspondió al hongo del género *Macrophomina*. Las colonias desarrolladas en dicho medio presentaron crecimiento micelial denso, de aspecto veloso, al inicio eran de color gris oscuro (1 a 6 días) y posteriormente se tornaron de coloración negra (fig. 1A). En algunas colonias de más de 5 días de edad, se desarrollaron microesclerocios de forma esférica a irregular, negros, lisos, duros y de 85-130 μm de diámetro. Los microesclerocios observados en la base de los tallos de caña de azúcar presentaron forma irregular, color negro y la superficie lisa (fig. 1B). No se observó la formación de picnidios en medio de cultivo PDA, sin embargo, los picnidios desarrollados en los tejidos infectados fueron usualmente solitarios, globosos, negros, de 165-260 μm y con ostiolo truncado (fig. 1C). Las células conidiogénicas fueron hialinas, obpiriformes a subcilíndricas y se encontraron recubriendo la superficie interior del picnidio. Los conidios inmaduros fueron hialinos, cilíndricos a elipsoidales, unicelulares, de 10,64-19,56 \times 3,91-6,45 μm (fig. 1D). Los conidios maduros se produjeron esporádicamente y estos presentaron color café claro, con pared exterior de consistencia granular y con apéndices mucoides. Las características de las colonias y de las estructuras de reproducción asexual coincidieron con las descripciones de *M. phaseolina* reportadas por Crous *et al.*⁶, Phillips *et al.*¹¹ y Sarr *et al.*¹³. Sin embargo, los conidios analizados en este estudio fueron ligeramente más pequeños comparados con los registrados en otros trabajos referidos a *M. phaseolina*. Lo anterior puede deberse a que las estructuras analizadas en microscopía de luz y MEB fueron obtenidas directamente a partir de picnidios (fig. 1E) con producción de conidios inmaduros (fig. 1F), los cuales se desarrollaron en el tejido del hospedante. Además, de acuerdo con Babu *et al.*², *M. phaseolina* es una especie muy heterogénea respecto de su morfología, fisiología, ecología y características genéticas.

La importancia de este estudio radica en que si bien a nivel mundial existen diversos reportes que describen las características de las colonias y las estructuras de reproducción asexual de aislados de *M. phaseolina* obtenidos de varios cultivos de importancia agrícola, este es el primero que presenta datos morfológicos de este hongo asociado a la presencia de síntomas de pudrición carbonosa en plantas de caña de azúcar.

Para los 2 aislados fúngicos analizados, con la PCR descrita se logró la amplificación de fragmentos de la región ITS del ADNr de un tamaño de 350 pb. Esto confirmó que estos 2 aislados pertenecen a la especie *M. phaseolina*, dado que los iniciadores MpKFI y MpKRI son específicos para esta especie de hongo. Asimismo, la comparación de las secuencias KJ577740 y KJ577741 obtenidas en este estudio mostró un 100% de similitud con las secuencias KF951786-KF951802 depositadas en la base de datos del GenBank. De acuerdo con Babu *et al.*², las secuencias de ADN obtenidas con los iniciadores específicos MpKFI y MpKRI pueden ser utilizadas para identificar de manera rápida, selectiva y específica el hongo *M. phaseolina*. De manera similar, Zhang *et al.*¹⁵ y Sánchez *et al.*¹² usaron los iniciadores específicos MpKFI y MpKRI para la identificación

y detección de aislados de *M. phaseolina* en el cultivo de fresa y frijol mungo (*Vigna radiata* L.), respectivamente.

Cabe resaltar la necesidad de la adecuada detección e identificación de *M. phaseolina*, ya que esta especie fitopatógena presenta una amplia distribución global y ocasiona pérdidas en cultivos de gran importancia agrícola, particularmente en ambientes cálidos². Además, la detección temprana y el diagnóstico adecuado de patógenos es un aspecto fundamental en la agricultura, para desarrollar y poner en práctica diversas estrategias de manejo de enfermedades. La falta de precisión y sensibilidad de las técnicas convencionales basadas en estudios morfológicos ha alentado el desarrollo de técnicas moleculares, que podrían reemplazar a las primeras.

En conclusión, este estudio presenta datos de caracterización morfológica usando microscopía de luz y MEB de 2 aislados de *M. phaseolina* obtenidos de plantas de caña de azúcar con síntomas de pudrición carbonosa. La correcta identidad de estos 2 aislados se confirmó a través de la amplificación de secuencias de la región ITS del ADNr con el uso de iniciadores específicos.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Babu BK, Saxena AK, Srivastava AK, Arora DK. Identification and detection of *Macrophomina phaseolina* by using species-specific oligonucleotide primers and probe. *Mycologia*. 2007;99:797-803.
2. Babu BK, Saikia R, Arora DK. Molecular characterization and diagnosis of *Macrophomina phaseolina*: A charcoal rot fungus. En: Gherbawy Y, Voigt K, editores. *Molecular Identification of Fungi*. New York: Springer; 2010. p. 179-93. Chapter 9.
3. Babu BK, Babu TK, Sharma R. Molecular identification of microbes: I. *Macrophomina phaseolina*. En: Arora DK, Das S, Sukumar M, editores. *Analyzing microbes*. New York: Springer; 2013. p. 93-7. Chapter 6.
4. Bains OM, Salazar SM, Ramallo AC, Kirschbaum DS. First report of *Macrophomina phaseolina* causing strawberry crown and root in Northwestern Argentina. *Plant Dis*. 2011;95:1477.
5. Beas-Fernández R, de Santiago-de Santiago A, Hernández-Delgado S, Mayek-Pérez N. Characterization of Mexican and non-Mexican isolates of *Macrophomina phaseolina* based on morphological characteristics, pathogenicity on bean seeds and endoglucanase genes. *J Plant Pathol*. 2006;88:53-60.
6. Crous PW, Slippers B, Wingfield MJ, Rheeder J, Marasas WFO, Phillips AJL, Alves A, Burgess T, Barber P, Groenewald JZ. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Stud Mycol*. 2006;55:235-53.

7. Gaetán SA, Fernandez L, Madia M. First report of charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina* in Argentina. *Plant Dis.* 2006;90:524.
8. Leyva-Mir SG, Velásquez-Martínez GC, Tlapal-Bolaños B, Alvarado-Gómez OG, Tovar-Pedraza JM, Hernandez-Arenas M. First report of charcoal rot of sugarcane caused by *Macrophomina phaseolina* in Mexico. *Plant Dis.* 2014, <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-06-14-0652-PDN>.
9. Mayek-Pérez N, López-Castañeda C, González-Chavira M, García-Espinosa R, Acosta-Gallegos J, Martínez-de la Vega O, Simpson J. Variability of Mexican isolates of *Macrophomina phaseolina* based on pathogenesis and AFLP genotype. *Physiol Mol Plant Pathol.* 2001;59:257–64.
10. Mihail JD. *Macrophomina*. En: Singleton LL, Mihail JD, Rush CM, editores. *Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi*. Minnesota: APS Press; 2001. p. 134–6.
11. Phillips AJL, Alves A, Abdollahzadeh J, Slippers B, Wingfield MJ, Groenewald JZ, Crous PW. The Botryosphaeriaceae: Genera and species known from culture. *Stud Mycol.* 2013;76: 51–167.
12. Sánchez S, Gambardella M, Henríquez JL, Díaz I. First report of crown rot of strawberry caused by *Macrophomina phaseolina* in Chile. *Plant Dis.* 2013;97:996.
13. Sarr MP, Ndiaye MB, Groenewald JZ, Crous PW. Genetic diversity in *Macrophomina phaseolina*, the causal agent of charcoal rot. *Phytopathol Mediterr.* 2014;53:250–68.
14. Slippers B, Boissin E, Phillips AJL, Groenewald JZ, Wingfield MJ, Postma A, Burgess T, Crous PW. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriales: A systematic and evolutionary framework. *Stud Mycol.* 2013;76:31–49.
15. Zhang JQ, Zhu ZD, Duan CX, Wang XM, Li HJ. First report of charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina* on mungbean in China. *Plant Dis.* 2011;95:872.