

# AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *Moniliophthora roreri*, CAUSANTE DE LA MONILIASIS DEL CACAO

**García Hernández, C.<sup>\*a</sup>, Ortiz-García, C.F.<sup>b</sup>, X. M. Boldo<sup>c</sup> y Bautista-Muñoz, C.<sup>a</sup>**

Estudiante del Programa de Maestría en Ciencias PROPAT\*, Área de Ciencia de Alimentos e Ingeniería<sup>a</sup>, Área de Ciencia Vegetal<sup>b</sup>, Periférico Carlos A. Molina S/N, Km. 3.5. H. Cárdenas Tabasco. Colegio de Postgraduados Campus Tabasco. Centro de Investigación y Postgrado, DACS-UJAT, Av. Gregorio Méndez # 2838-A, Col. Tamulte, Villahermosa, Tab. E-mail:

[cbautistam@colpos.mx](mailto:cbautistam@colpos.mx)

## INTRODUCCIÓN

En Tabasco la actividad cacaotera es muy importante por su aportación al valor de la producción agrícola estatal, ocupando el primer lugar en producción a nivel nacional (López-Andrade y col., 1996). La actividad cacaotera en el estado se encuentra amenazada por la moniliasis del cacao, enfermedad causada por el hongo *Moniliophthora roreri* (Cif.) Evans *et al.*, el cual solo ataca frutos de especies pertenecientes a los géneros *Theobroma* y *Herrania*, destruyendo parcial o totalmente las semillas, lo que lo convierte en una enfermedad muy destructiva en la mayoría de los países donde se presenta (Phillips y col., 2006; Porras y González, 1984). En México, la presencia de este hongo se reportó por primera vez en Chiapas en 2005 (Phillips y col., 2006) y ha avanzado al Estado de Tabasco. La identificación inicial de la moniliasis se llevó a cabo por observación de sintomatología y posteriormente se usó la técnica del PCR para la identificación molecular. Las técnicas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), han demostrado su utilidad en estudios de diversidad genética, ciclos de vida, ecología, filogenia e identificación de hongos. La técnica conocida como PCR-ITS (PCR- Internal Transcribed Spacer, por sus siglas en inglés) permite replicar *in vitro* miles de veces muestras específicas de la región interna de genes ribosomales de especies fungosas, para producir suficiente cantidad para el análisis de sus pares de bases que al ser comparados con la de otros, permita ubicarlos taxonómicamente. Los genes amplificados y comparados son los DNA ribosomales (18S, 5.8S y 28S), los cuales están altamente conservados (Foster y col., 1993). Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue implementar una prueba molecular basada en la amplificación del gel 18S DNAr, para la identificación del hongo *Moniliophthora roreri*, patógeno del cacao.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajó con una cepa aislada de frutos enfermos de cacao colectada en la Ranchería Platanal Abajo Segunda Sección, Pichucalco, Chiapas. El hongo fue aislado en medio de cultivo sólido V8 enriquecido (Jugo V8 al 20%, Asparagina al 0.1%, Maltosa al 2% y Agar al 2%). El crecimiento micelial fue inducido en medio líquido V8 enriquecido para la extracción de DNA, la cual fue realizada siguiendo la metodología descrita por Ausebel y col. (1989). El DNA obtenido fue sometido a electroforesis en geles de agarosa al 0.8% para evaluar la calidad y fue cuantificado por espectrofotometría. La amplificación fue realizada empleando los iniciadores universales LV1 (5'CCTGCCAGTAGTCATATGCTTGCT3') y LV2 (5'CACCTACGGAAACCTTGTTACGACT3') para la amplificación del gen 18S DNAr. Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo en un volumen final de 25 µL con la siguiente formulación: agua grado PCR estéril 16.3 µL; solución amortiguadora 1X; MgCl<sub>2</sub> 2mM ; dNTPs



200 mM, iniciadores 0.4 mM; Taq DNA polimerasa 1U y 10 ng del DNA molde. El DNA fue amplificado en un termociclador Techgene® con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 min; alineamiento a 67 °C por 1 min y extensión a 72 °C por 1 min; y una extensión final a 72 °C por 5 min. Los productos amplificados fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa (1%) en regulador TAE 1X a 100 V durante una hora de corrimiento. El gel fue teñido en TAE 1X con Bromuro de etidio (0.5 µg/mL) durante 15 minutos y expuesto a luz UV en un transiluminador UV MiniBis (Bio Imaging Systems), para visualizar los fragmentos de DNA amplificados. Los fragmentos de DNA amplificados fueron purificados empleando el kit Ultraclean™ Gel Spin™ DNA Purification, siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. El tamaño de los fragmentos se calculó por comparación con un marcador de talla molecular de DNA de 100 pb y con ayuda del programa Sigma Gel Versión 1.0 (Jandel Scientific Co., 1995). El producto de PCR purificado fue enviado a secuenciar al Instituto Nacional de Salud Pública en Cuernavaca, Morelos. Las secuencias de DNA fueron analizadas con el software Chromas Versión 2.31 (Technelysium Pty Ltd.) y alineadas con secuencias depositadas en la base de datos de la NCBI (National Center for Biotechnology Information; www.ncbi.nlm.nih.gov).

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se logró amplificar un fragmento de 3723 pb aproximadamente, con ambos con iniciadores universales para amplificar el 18S DNAr. La secuencia sentido obtenida con el iniciador LV1 fue de 254 pb y se indica a continuación:

```
CCAAAGATTACGCATGCATGTCTAAGATCTCAGAGAGATAGTGAAACTGCGAATCTCCTCAT  
TAGAGAGATATAGTTTATTTGATGATACCTTGCTACATGGATAACTGTGTCACTTCTAGAGCT  
AATACATGCATTAAGCCCCGACTTCTGGGAGGGGTGATTTATTAGATAAAAAACCAACGC  
GGCTCGCCGCTCACTTGGTGATTCATAATAACTTCACGAATCGAATGGCCTTGTGCCGGCG  
ATGCTT.
```

La secuencia antisentido obtenida con el iniciador LV2 fue de 441 pb y se indica a continuación:

```
TTTACTTCCTCTAAATGACCAAGTTTGAACCAACTTCTACAAAAGACAGGGTGCCGTTGCC  
GCTCCCCGAAGCCAATCCGGAGACCTCACTAAGCCATTCAATCGGTAGTAGCGACGGGCG  
GTGGGGACAAAGGGCAGGGACGTAATCAACGCAAGCTGATGACTTGCGCTTACTAGGTATT  
CCTCGTTGAAGAGCAATAATTGCAATGCTCTATCCCCAGCACGACAGAGTTTCACAAGATTA  
CCCAGACCTTTTCGGCCAAGGTGGACACTCGCTGGCTCTGTGTCAGTGTAGCGCGCGTGCCGC  
CCAGAACATCTAATGTTTTACAGACCTGTTATTGCCTCAAACCTCCGTGAGCTAGACGCTG  
ACAGTCCCTCTAAGAAGACGGAGGCCAACCAAGTCGGCCTGTCTATTTACAGGTTAAGGT  
CTCGTTTCGTTATC.
```

La secuencia parciales obtenidas fueron sujetas a una búsqueda con el con el programa en línea BLAST versión 2.2.3 (Altschul y col., 1990). Los alineamientos múltiples fueron llevados a cabo con CLUSTAL X versión 1.8 (Thompson y col., 1997) seleccionando las secuencias emparentadas depositadas en el GeneBank del NCBI. Los porcentaje de similitud nucleotídica se calcularon con ayuda del programa MEGA versión 2.1 (Kumar y col., 2001). Las secuencias sentido y antisentido se alinearon con la secuencia del gen 18S DNAr de *M. roreri* (Número de acceso AY916745) con un porcentajes de similitud de 97% y 96%, respectivamente. Finalmente, con los datos del alineamiento múltiple, se construyó el árbol filogenético basado en las secuencias del gene 18S DNAr de *M. roreri* y las secuencias de los hongos filogenéticamente mas emparentados.

### CONCLUSIONES

La amplificación y secuenciación del gel 18S DNAr, permitió la identificación molecular del hongo *Moniliophthora roreri*, agente causal de la moniliasis del cacao, enfermedad de reciente introducción en el sureste de México.

### BIBLIOGRAFÍA

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) "Basic local alignment search tool." J. Mol. Biol. 215:403-410. PubMed
- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith y K. Struhl. 1989. Current protocols in molecular biology. Greene publishing associates and Wiley-Interscience.



*XIX REUNIÓN CIENTÍFICA-TECNOLÓGICA FORESTAL Y AGROPECUARIA TABASCO'2006*  
*16 y 17 de noviembre del 2006, Villahermosa, Tab.*

---

---

**Foster, D. M., Kozak, K. R., Loftus, M. G., Stevens, J. J., and Ross, I. K. 1993.** The polymerase chain reaction and its application to filamentous fungi. *Mycological Research*. 97:769-781.

**Kumar, S., Tamura, I. B. Jakobsen y M. Nei. (2001).** MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics*. 17:1244-1245.

**López, A. P. A., V. H. Delgado N. y A. Azpeitia M. 1996.** El cacao *Theobroma cacao* L. en Tabasco. INIFAP. Campo experimental Huimanguillo.

**Phillips, M. W., A. Coutiño, C. F. Ortiz, A. P. López, J. Hernández and M. C. Aime. 2006.** First report of *Moniliophthora roreri* causing frosty pod rot (moniliasis disease) of cocoa in México. *Plant Pathology*. 55:584.

**Porras U., V. H. & González L.C. 1984.** Epifitiología de la moniliasis del cacao (*Monilia roreri*) y su relación con el ciclo de producción en la zona de Matina, Costa Rica. *Fitopatología*. 19:78-84.

**Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin y D. G. Higgins. (1997).** The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*. 24:4876-4882.