

DETECCIÓN DE *Penicillium expansum* EN MANZANA POR LA TÉCNICA DE PCR

Efraín Valeriano Cruz-Flores¹, Martha Yolanda Quezada-Viay², Josefina Moreno-Lara^{1,2}, Ernesto Moreno-Martínez² y José Francisco Montiel-Sosa¹

¹Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la FESC-UNAM, ²Unidad de Investigación en Granos y Semillas de la FESC-UNAM

yolaqviay@gmail.com

Resumen

La oportuna detección e identificación de *Penicillium expansum* es imprescindible para la evaluación posterior de su potencial como fitopatógeno en poscosecha. El objetivo del trabajo fue evaluar el potencial de la técnica molecular Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), estas técnicas suelen tener ventajas sobre las técnicas morfológicas, ya que ofrecen mayor rapidez y alta especificidad. Se seleccionaron manzanas Golden Delicious aparentemente sanas y se inocularon por punción con *Penicillium expansum* del aislamiento con clave 61MCA. Se extrajo ADN de la fruta y se sometió a PCR con los primers para el gen de la poligalacturonasa de *P. expansum* pepg1. Se comprobó que la especie de *P. expansum* se puede detectar directamente en frutos de manzana con síntomas de pudrición sin necesidad de la identificación morfológica que implica: aislar el hongo de las manzanas, obtener cultivos puros, desarrollarlo en medios específicos en diferentes temperaturas, medir estructuras macro y micromorfológicas y seguir claves especializadas.

Palabras clave: moho azul, *Malus domestica* L., PCR, poligalacturonasa, pepg1

Introducción

El hongo fitopatógeno *Penicillium expansum* es el causante de la enfermedad de mayor importancia económica de frutas y hortalizas en la poscosecha, la enfermedad del moho azul que puede implicar la producción de la micotoxina patulina (Errampali, 2014). La dimensión de las pérdidas poscosecha por moho azul en frutas va de 5 a 25% en países desarrollados (Capellini y Ceponis, 1984) y arriba de 50% en países en vías de desarrollo (El-Ghaouth, 1997). El hongo *Penicillium expansum* contamina tanto en el

exterior como en el interior de las manzanas, siendo en ocasiones difícil identificar su presencia, por lo que los derivados de la manzana, como son los jugos y papillas, también pueden contener patulina. La patulina se reconoce principalmente por inducir trastornos gastrointestinales con ulceración, distensión y sangrado, y a dosis más altas, alteraciones en la función renal (Puel *et al.*, 2010; Anguiano *et al.*, 2012).

Objetivo

Aplicar la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), para llevar a cabo la amplificación de ADN y de esta manera lograr la identificación molecular directa de *Penicillium expansum* presente en manzanas (*Malus domestica* L.) en poscosecha.

Metodología

Se adquirieron manzanas maduras, sanas de la variedad Golden Delicious. Se seleccionaron manzanas aparentemente sanas, cinco usadas como testigo y seis inoculadas por punción de inóculo con *Penicillium expansum* del aislamiento con clave 61MCA.

Para conocer si es posible identificar el hongo *P. expansum* directamente en las manzanas, se llevó a cabo la extracción de ADN de la fruta empleando el KIT Wizard Magnetic DNA Purification System for Food (Figura 1). La concentración de ADN extraído en cada muestra fue cuantificada posteriormente con un espectrofotómetro.

Se seleccionaron los *primers* de acuerdo a Elhariry *et al.* (2011), quienes lograron identificar específicamente a *P. expansum* a partir del gen de la *poligalacturonasa* (Tabla 1).

Tabla 1. Primers específicos para *Penicillium expansum*.

| Primer | Secuencia de (5´ → 3´) | Amplificado |
|----------------|-------------------------------|--------------------|
| Frontal | ATCGGCTGCGGATTGAAAG | 404 pb |
| Reverso | AGTCACGGGTTTGGAGGG A | |

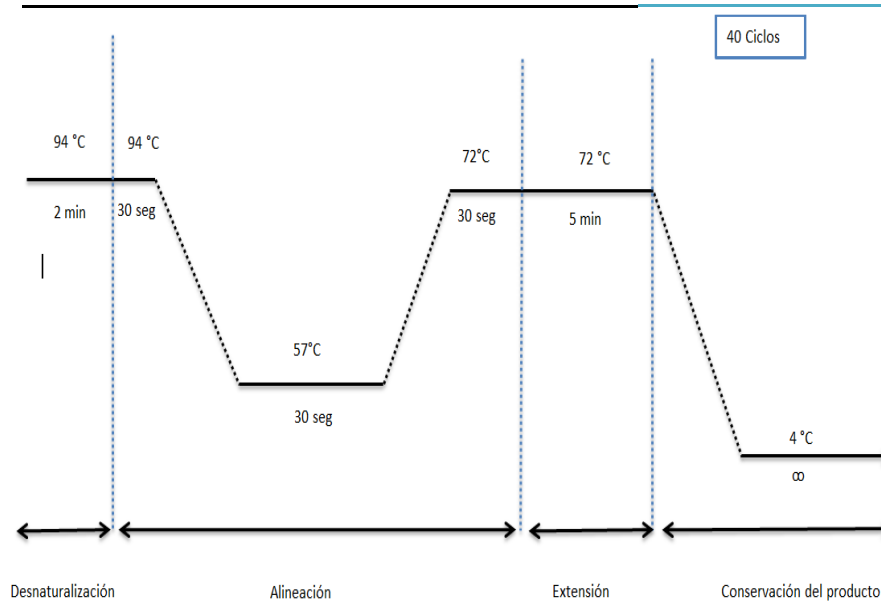


Figura 1. Condiciones de PCR para la identificación de *P. expansum*

Resultados

Cantidad y calidad del ADN extraído:

La concentración del ADN extraído en cada muestra fue cuantificada en un espectrofotómetro, los valores de concentración y pureza se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Concentración de ADN y relación 260/280 de las muestras de manzanas sanas o inoculadas con *Penicillium expansum*

| Manzana | Concentración de ADN | |
|-------------|--------------------------|------------------|
| | (ng μL^{-1}) | Relación 260/280 |
| Sana 1 | 118.9 | 1.45 |
| Sana 2 | 69.9 | 1.8 |
| Sana 3 | 61.1 | 1.5 |
| Sana 4 | 70 | 1.55 |
| Sana 5 | 62.9 | 1.69 |
| Inoculada 1 | 83.0 | 4.72 |
| Inoculada 2 | 47.6 | 5.83 |
| Inoculada 3 | 44.1 | 4.82 |
| Inoculada 4 | 39.3 | 4.72 |
| Inoculada 5 | 39.8 | 5.69 |
| Inoculada 6 | 41.9 | 5.14 |

En la Figura 2 se muestra el análisis electroforético donde se evalúan los productos de la PCR, utilizando los primers del gen *pepg1* que codifica para la *poligalacturonasa* de *P. expansum*. Al utilizar el ADN de cinco diferentes muestras de manzanas aparentemente sanas, obtenidas de diferentes sitios comerciales, se puede observar que en ninguna se obtuvo un amplificado, demostrando que las muestras estaban libres de *P. expansum* (Figura 2A).

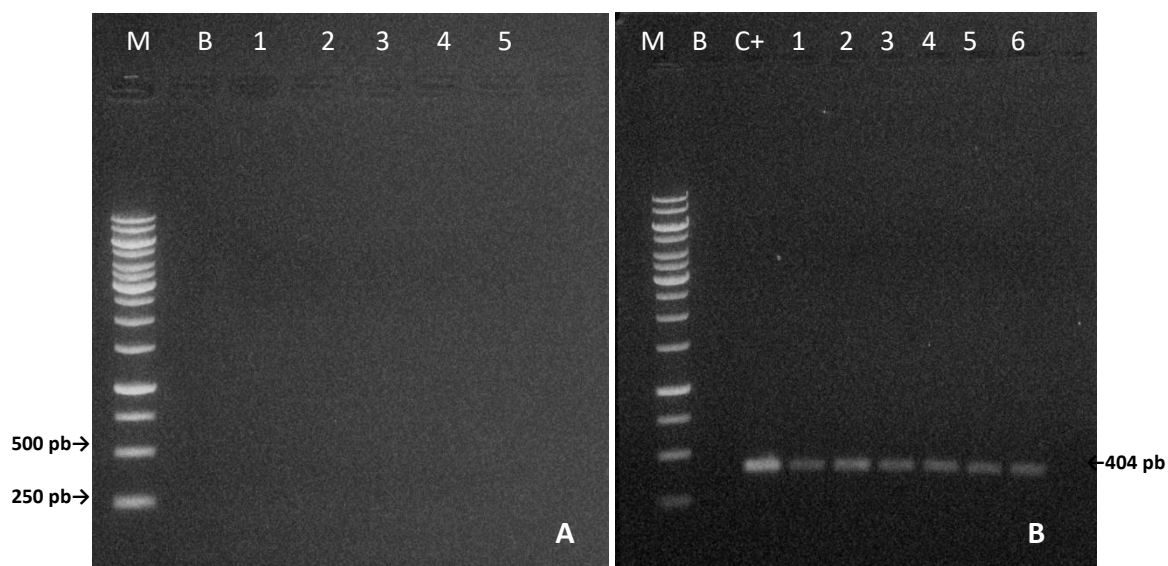


Figura 2. Evaluación electroforética en gel de agarosa al 1% del producto de PCR con primers para amplificar el gen *pepg1* que codifica para la poligalacturonasa de *P. expansum*, Panel A: en manzanas aparentemente sanas. Panel B: en manzanas inoculadas con *P. expansum*. MP: Marcador de peso molecular 1 Kb, B: Blanco, M1-5: Muestra 1, 2, 3, 4 y 5.; C+: Control positivo, M6-: Muestra 1, M1.1: Muestra 1.1, M2: Muestra 2, M2.1: Muestra 2.1, M3: Muestra 3, M3.1: Muestra 3.1.

Discusión

Respecto a los valores obtenidos en cuanto a la relación 260/280 que es un índice de la pureza del ADN, se puede observar que están por abajo de lo ideal que es aproximadamente 1.8 a excepción de la muestra 2, lo cual muestra que el ADN extraído está contaminado con proteínas. Pero en cuanto a las concentraciones de ADN se observa que son altas indicando que este ADN es apto para ser utilizado en la reacción de PCR.

Conclusión

Se comprobó que la especie *Penicillium expansum* se puede detectar directamente en frutos de manzana con síntomas de pudrición sin necesidad de aislar el hongo.

Agradecimientos

Se reconoce el apoyo recibido por el proyecto PAPIME con clave PE204217.

Referencias

Anguiano, C. J. (2012). Contaminación por hongos filamentosos en manzana: amenaza para la salud y la economía. *Cienciabiota*. No.31 Julio-Septiembre.

Cappellini, R., & Ceponis, M. (1984). *Postharvest losses in fresh fruits and vegetables*. *Plant Pathology* 132: 24-30.

El-Ghaouth, A. (1997). *Biologically-based alternatives to synthetic fungicides for the control of postharvest diseases*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 19: 160-162.

Elhariry, H. & Bahobial, A. & Gherbawy, Y. (2010). *Genotypic identification of Penicillium expansum and the role of processing on patulin presence in juice*. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 49. 941-6.

Errampali, D. (2014). *Postharvest decay. Control strategies*. Academic Press. Agriculture and Agri-Food Canada, SCPFRC, Vineland Station, ON, Canada. pp.189-231.

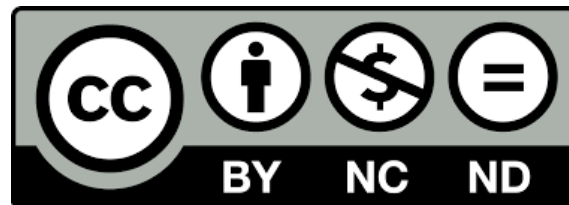
Puel, O., Galtier, P., Oswald, IP. (2010). *Biosynthesis and Toxicological Effects of Patulin*. *Toxins*. 2(4):613-631.



D. R. © UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

Excepto donde se indique lo contrario esta obra está bajo una licencia Creative Commons Atribución No comercial, No derivada, 4.0 Internacional (CC BY NC ND 4.0 INTERNACIONAL).

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



ENTIDAD EDITORA

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

Av. Universidad 3000, Universidad Nacional Autónoma de México, C.U., Delegación Coyoacán, C.P. 04510, Ciudad de México.

FORMA SUGERIDA DE CITAR:

Cruz-Flores, E. V., Quezada-Viay, M. Y., Moreno-Lara, J. Moreno-Martínez, E., y Montiel-Sosa, J. F. (2018). Detección de *penicillium expansum* en manzana por la técnica de PCR.

MEMORIAS DEL CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA (CONATEC), Año 1, No. 1,

septiembre 2018 - agosto 2019. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM.

https://tecnicosacademicos.cuautitlan.unam.mx/CongresoTA/memorias2018/mem2018_paper28.html