Moniliophthora roreri: Identificación Molecular

M. Catherine Aime & Jorge Díaz-Valderrama, no publicado. Mayo 2022.

Extracción de ADN

Se puede utilizar cualquier tipo de método de extracción de hongos como CTAB. Sin embargo, utilizamos el Wizard® Genomic Purification Kit para extracciones de ADN porque es simple, práctico y funciona bien::

https://www.promega.com/products/nucleic-acid-extraction/genomic-dna/wizard-genomic-dna-purification-kit/?catNum=A1120

La extracción de ADN se realizará a partir del tejido de frutos infectados de cacao obtenido en campo (este tejido se puede ser el estroma blanco en la superficie de los frutos, de aislados en medio de cultivo, o de tejido necrótico interno, como se explica en la hoja de muestreo de campo). Se seguirá los procedimientos del fabricante. La homogenización inicial del tejido para extracción se realizará con pistilos para tubos Eppendorf. Opcional: Para acelerar el paso inicial de homogenización, podemos usar perlas de zirconio de 2 mm en un equipo de homogenización como el Mini-Beadbeater-24 (BioSpec Products) durante 5 minutos.

La cuantificación y evaluación de la pureza del ADN se puede realizar midiendo las proporciones de absorbancia de la luz ultravioleta a 260 nm sobre 280 nm (A260/280) y 230 nm (A260/230), indicadores ampliamente utilizados de la pureza de los ácidos. Estas evaluaciones se pueden realizar en un espectrofotómetro, por ejemplo, el NanoDrop™ One (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA). La mayoría de las proteínas tienen las absorbancias más fuertes a 280 nm mientras que otras impurezas como fenoles y sales, a 230 nm. Por lo tanto, los valores de relación A260/280 y A260/230 inferiores a los umbrales de 1,8 y 2,0, respectivamente, indican contaminación de proteínas y/u otras impurezas. Si no se dispone de un NanoDrop, la concentración de ADN se puede estimar a partir de un gel de agarosa usando una escalera molecular o un marcador de ADN de cantidad conocida. Una vez extraído el ADN, la concentración para realizar las reacciones de PCR se debe ajustar entre 0.2 y 4.0 ng/µl para obtener los mejores resultados.

Primers *o cebadores para confirmar la identificación de* Moniliophthora roreri

Moniliophthora roreri es un hongo basidiomiceto. Por lo tanto, se deben usar e cebadores diseñados para basidiomicetos para obtener los mejores resultados. Esto no es tan importante si se trabaja con aislados en medio de cultivo, pero es muy importante si se está tratando de trabajar con el estroma blanco tomado de la superficie de las vainas desecadas ya que estas pueden tener muchos otros hongos ambientales.

La region ITS (*Internal transcribed spacer region*) es el código de barras fúngico y se puede usar para confirmar *M. roreri*. Los cebadores (ITS1-F e ITS4-B) se detallan en el siguiente cuadro, y los protocolos para la amplificación se encuentran descritos en Aime & Phillips-Mora 2005.

PURDUE UNIVERSITY

M. Catherine Aime, Dept. Botany & Plant Pathology, West Lafayette, IN 47907, USA

UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS

Jorge R. Díaz-Valderrama, Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva, Chachapoyas, Peru

ITS1-F	CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A	Gardes & Bruns 1993
ITS4-B	CAG GAG ACT TGT ACA CGG TCC AG	Gardes & Bruns 1993

Gardes M, Bruns TD. 1993. ITS primers with enhanced specifity for Basidiomycetes: application to identification of mycorrhizae and rusts. Mol Ecol 2:113-118.

***Prueba diagnóstica para confirmar los* "mating types" *de* Moniliophthora roreri *amplificando los genes de apareamiento* (MAT *loci*)**

Para determinar el *mating type* de *M. roreri* hemos desarrollado cebadores específicos que se pueden usar como prueba de diagnóstico en un gel de agarosa sin necesidad de secuenciar. Nuestros datos muestran que hay dos genotipos invasivos de *M. roreri*. El *mating type A1B1* es el genotipo más invasivo, es el único genotipo presente en América Central y el genotipo que invadió Jamaica recientemente. El *mating type A2B2* es más común en América del Sur y recientemente ha invadido Perú (Díaz-Valderrama y Aime 2016).

Los cebadores se diseñaron de tal manera que el diagnóstico de los alelos de los *MAT* loci se basase en la presencia o ausencia de la banda de amplificación en el gel de agarosa. Estos cebadores discriminarán efectivamente entre todos los alelos de los *A* y *B MAT* loci reportados sin necesidad de secuenciación de Sanger (Figuras 4 y 5). Esto permitirá la detección rápida de un tipo de apareamiento de *M. roreri* en áreas donde no se ha observado previamente la enfermedad.

Tabla 1. Cebadores específicos para diagnosticar e identificar los alelos de los *MAT* loci en *Moniliophthora roreri*

Gen	Alelo *MAT*	Nombres y secuencias de los cebadores (5' - 3')		Tamaño del producto de PCR (pares de bases)	Condiciones de termociclado
Mr_HD1	*A1*	Mr_HD1_both_R	GGAAGAGTGATGGGCACAGA	1192	95ºC, 2 min; 35 ciclos de 95ºC, 30 s 57ºC, 30 s 72ºC, 1min 45 s; 72 ºC, 5 min
		Mr_HD1_A1_F	AGTCTGCGGTGGACAATTTCA		
Mr_HD1	*A2*	Mr_HD1_both_R	GGAAGAGTGATGGGCACAGA	1166	
		Mr_HD1_A2_F	TATGAAGACCCAGCGCAAGT		
Mr_HD2	*A1*	Mr_HD2_Int_R	CTCTTCGTTCCTGCCTCGTT	1263	
		Mr_HD2_A1_R2	ATGGGTATTCCAACGGCCTCT		

PURDUE UNIVERSITY

M. Catherine Aime, Dept. Botany & Plant Pathology, West Lafayette, IN 47907, USA

UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS

Jorge R. Díaz-Valderrama, Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva, Chachapoyas, Peru

Mr_HD2	*A2*	Mr_HD2_Int_R	CTCTTCGTTCCTGCCTCGTT	1275	
		Mr_HD2_A2_R2	ATGGGTATTCCGACGCTTCC		
STE3_Mr4	*B1*	Mr_Rec4_F2	CCCTCTGGAACCAAAGATTCTG	572	95ºC, 2 min; 35 ciclos de 95ºC, 30 s 57ºC, 45 s 72ºC, 1min; 72 ºC, 5 min
		Mr_Rec4_R2	TGCACAGTCTGAGTAACGAGT		
STE3_Mr4	*B2*	Mr_R4_A2_F	ACATTGCGGTTCATCCCCAT	989	
		Mr_R4_A2_R	TAGATGAGCAAGCGTAGGCG		
Mr_Ph4	*B1*	Mr_Ph4_A1_F	CTTGCACGAAAGGCGAACAA	786	
		Mr_Ph4_A1_R	TTTATGTCGGAGGTGTGGGC		
Mr_Ph4	*B2*	Mr_Ph4_A2_F2	GGTGGACAAAAACTGGCGAC	622	

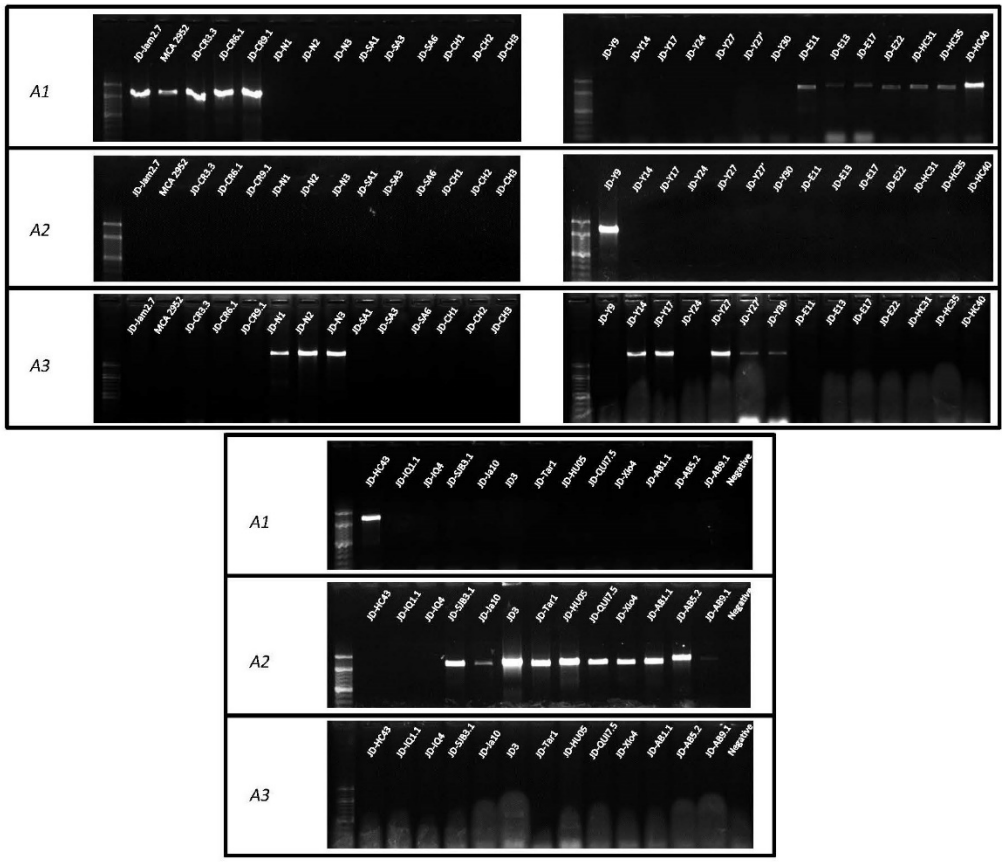
Diaz-Valderrama JR, Aime MC. 2016. The cacao pathogen Moniliophthora roreri (Marasmiaceae) possesses a tetrapolar mating system but reproduces clonally. Heredity 116:491-501. doi: 10.1038/hdy.2016.5

PURDUE UNIVERSITY

M. Catherine Aime, Dept. Botany & Plant Pathology, West Lafayette, IN 47907, USA

UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS

Jorge R. Díaz-Valderrama, Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva, Chachapoyas, Peru



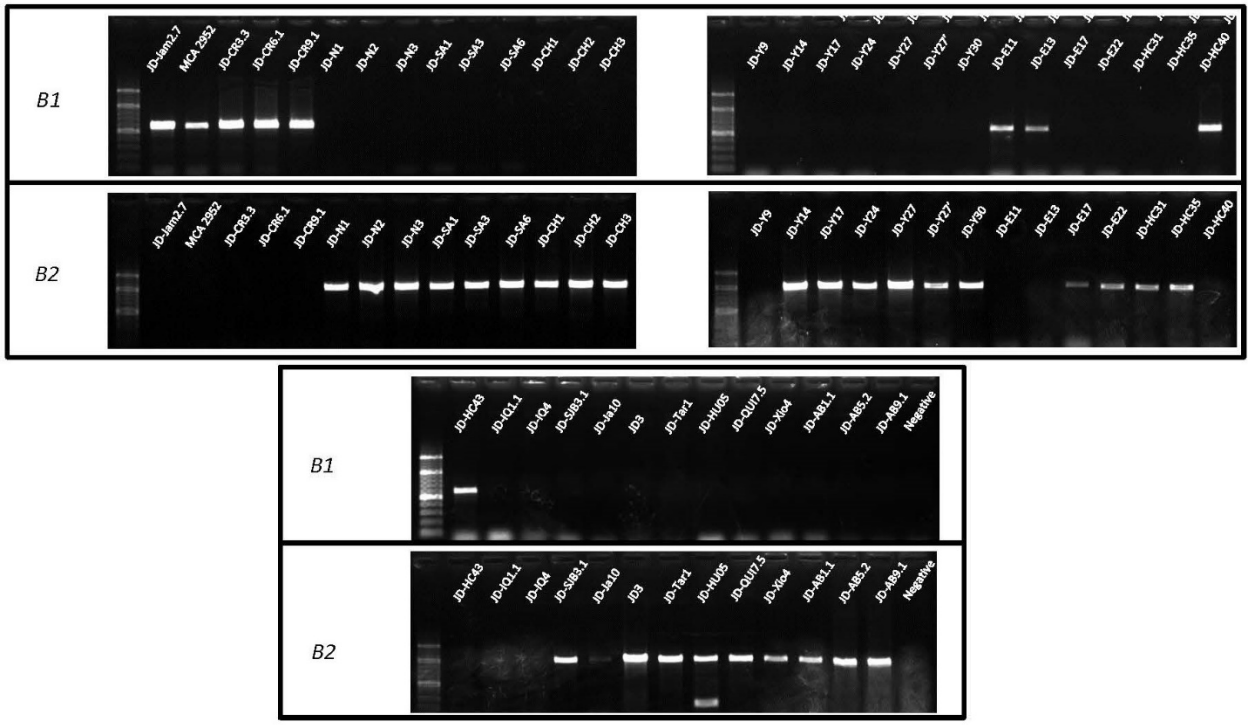
Genotipado del locus *A MAT*. Fotografías en gel de productos de PCR amplificados con cebadores diseñados para el diagnóstico de alelos del locus *A MAT* de *Moniliophthora roreri*. Los cebadores utilizados aquí fueron específicos para el gen *Mr_HD1* (Díaz-Valderrama y Aime 2016). Las muestras se organizan verticalmente mientras que el alelo *A*, horizontalmente. La escalera molecular utilizada fue O'RangeRuler™ de 100 pb (Thermo Fisher Scientific); las bandas conspicuas en las escaleras son 1500, 1000 y 500 pares de bases.

PURDUE UNIVERSITY

M. Catherine Aime, Dept. Botany & Plant Pathology, West Lafayette, IN 47907, USA

UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS

Jorge R. Díaz-Valderrama, Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva, Chachapoyas, Peru



Genotipado del locus *B MAT*. Fotografías en gel de productos de PCR amplificados con cebadores diseñados para el diagnóstico de alelos del locus *B MAT* de *Moniliophthora roreri*. Los cebadores utilizados aquí fueron específicos para el gen *STE3_Mr4* (Díaz-Valderrama y Aime 2016). Las muestras se organizan verticalmente mientras que el alelo *B*, horizontalmente. La escalera molecular utilizada fue O'RangeRuler™ de 100 pb (Thermo Fisher Scientific); las bandas conspicuas en las escaleras son 1500, 1000 y 500 pares de bases.

Referencias

Aime, M. C., & Phillips-Mora, W. (2005). The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, Theobroma cacao) form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycologia*, *97*(5), 1012-1022.

Díaz-Valderrama, J. R., & Aime, M. C. (2016). The cacao pathogen Moniliophthora roreri (Marasmiaceae) possesses biallelic A and B mating loci but reproduces clonally. *Heredity*, *116*(6), 491-501.

Gardes, M., & Bruns, T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular ecology*, *2*(2), 113-118.

PURDUE UNIVERSITY

M. Catherine Aime, Dept. Botany & Plant Pathology, West Lafayette, IN 47907, USA

UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS

Jorge R. Díaz-Valderrama, Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva, Chachapoyas, Peru