

**DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL
CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA FITOSANITARIA**

**Área de Diagnóstico Fitosanitario
Laboratorio de Micología**

Protocolo de Diagnóstico:
Septoria lycopersici
(Mancha foliar o Septoriosis del tomate)

Tecámac, Estado de México, agosto 2019



**GOBIERNO DE
MÉXICO**

AGRICULTURA
SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL



SENASICA
SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD,
INOCUIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA

Senasica, agricultura sana para el bienestar



Aviso

El presente protocolo de diagnóstico fitosanitario fue desarrollado en las instalaciones de la Dirección del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF), de la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), con el objetivo de diagnosticar específicamente la presencia o ausencia de *Septoria lycopersici*. La metodología descrita, tiene un sustento científico que respalda los resultados obtenidos al aplicarlo. La incorrecta implementación o variaciones en la metodología especificada en este documento de referencia pueden derivar en resultados no esperados, por lo que es responsabilidad del usuario seguir y aplicar el protocolo de forma correcta.

La presente versión podrá ser mejorada y/o actualizada quedando el registro en el historial de cambios.



I. ÍNDICE

1. OBJETIVO Y ALCANCE DEL PROTOCOLO	1
2. INTRODUCCIÓN	1
2.1 Información sobre la plaga	1
2.2 Información taxonómica.....	2
2.3 Flujo de trabajo.....	3
3. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN.....	4
3.1 Identificación morfométrica	4
3.1.1 Cortes histológicos.....	4
3.1.1.1 Interpretación de resultados	4
3.1.2 Incubación en papel secante.....	5
3.1.2.1 Interpretación de resultados	5
3.1.3 Aislamiento en medios de cultivo	5
3.1.3.1 Interpretación de resultados	6
3.2 Descripción morfométrica	6
3.2.1 Descripción colonial	6
3.2.2 Fase asexual (Anamorfo).....	7
3.3 Identificación del patógeno	8
4. REGISTROS	8
5. CONTACTO PARA INFORMACIÓN ADICIONAL.....	9
6. RECONOCIMIENTO	9
7. REFERENCIAS	9
8. ANEXOS.....	12
8.1 Signos y síntomas.....	12
8.2 Elaboración de montajes	12
8.2.1 Preparaciones temporales con cubreobjetos.....	12
8.2.2 Preparaciones temporales con cinta adhesiva	13
8.2.3 Preparaciones permanentes	13
8.3 Medios de montaje	13
8.4 Medios de cultivo	14
8.5 Corroboración mediante secuenciación.....	15
8.5.1 Extracción de DNA.....	15
8.5.2 Verificación de la calidad del DNA	16
8.5.3 Ensayo de PCR punto final	16
8.5.4 Controles para las pruebas moleculares	18
8.5.5 Interpretación de resultados de los ensayos de PCR punto final.....	18
8.5.6 Secuenciación y filogenia molecular	18
8.5.7 Interpretación de resultados	19

II. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología colonial de <i>Septoria</i>.....	7
--	----------



Figura 2. Estructuras de reproducción de <i>Septoria lycopersici</i>	8
Figura 3. Signos y síntomas de <i>Septoria lycopersici</i> en tomate.....	12
Figura 4. Filogenia molecular del género <i>Septoria</i>	20
Figura 5. Alineamiento múltiple de secuencias..	20

III. ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Primers utilizados en el ensayo de PCR punto final para la amplificación	17
Cuadro 2. Preparación de la mezcla de reacción para el ensayo de PCR punto final	17
Cuadro 3. Programa del termociclador para la amplificación del gen TEF-1 α	17
Cuadro 4. Programa del termociclador para la amplificación de la región ITS	18



1. OBJETIVO Y ALCANCE DEL PROTOCOLO

Describir la metodología aplicada en el Laboratorio de Micología del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria para la detección e identificación de *Septoria lycopersici*, mediante caracterización morfométrica y técnicas moleculares, a partir de semillas y tejido vegetal de tomate (*Solanum lycopersicum*) bajo las condiciones de uso de reactivos que aquí se detallan.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Información sobre la plaga

La viruela o septoriosis del tomate es una enfermedad foliar importante causada por el hongo *S. lycopersici* (Bassay Blum, 2000) que puede afectar a cultivos de tomate (*S. lycopersicum*) y papa (*S. tuberosum*), así como algunas otras solanáceas (MacNeill, 1950). Inicialmente, *S. lycopersici* se dividía en dos variantes: var. *lycopersici* y var. *malagutii*; sin embargo, diferencias morfológicas y moleculares las separan actualmente en dos especies distintas (Cline & Rossman, 2006). *S. lycopersici* fue primeramente reportada en Argentina en 1882, y más tarde en los Estados Unidos en 1896 (Sutton & Waterston, 1966); actualmente, se encuentra en muchas regiones productoras del mundo (Cabral, Marouelli, Lage & Café-Filho, 2013). En México no hay registro de su presencia.

En plantas infectadas por *S. lycopersici*, los primeros síntomas visibles son la presencia de pequeñas lesiones cloróticas que se distinguen más claramente a contra luz. Estos puntos cloróticos inicialmente miden de 2 a 4 mm de diámetro, pero pronto se ven rodeados por halos que al avanzar la enfermedad originan manchas más grandes por la coalescencia de las lesiones (Anexo 8.1). Transcurridos 10 días (o menos) si las condiciones ambientales son húmedas y frescas, se observa, en la parte central de las lesiones, la aparición de pequeños puntos negros que corresponden a los picnidios del hongo, los cuales liberan esporas que darán origen a las infecciones secundarias. La enfermedad es mayormente foliar y solo bajo raras excepciones puede afectar peciolo, tallos y el cáliz de los frutos (MacNeill, 1950).

El desarrollo de esta enfermedad depende de las condiciones ambientales, siendo favorecida por una humedad relativa cercana al 100% acumulada durante 48 horas y temperaturas entre 15 y 27 °C (Zitter, 1987). Bajo estas condiciones, *S. lycopersici* puede causar severas defoliaciones y, consecuentemente, pérdidas económicas significativas (Ferrandino & Elmer, 1992). En Estados Unidos se han reportado defoliaciones cercanas al 80%, mientras que en la India casi el 100 % del cultivo defoliado (Bassay Blum, 2000). En México la enfermedad tiene el potencial de afectar a más de 50 000 ha sembradas con jitomate con un valor de producción anual de 25 483 434.73 de pesos (SIAP, 2017).



2.2 Información taxonómica

Nombre Anamorfo: *Septoria lycopersici* Speg.

Nombres comunes: Septoriosis del tomate (español)

Viruela del tomate (español)

Septoria leaf spot (Ingles)

Posición taxonómica:

Dominio: Eukaryota

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Dothideomycetes

Orden: Capnodiales

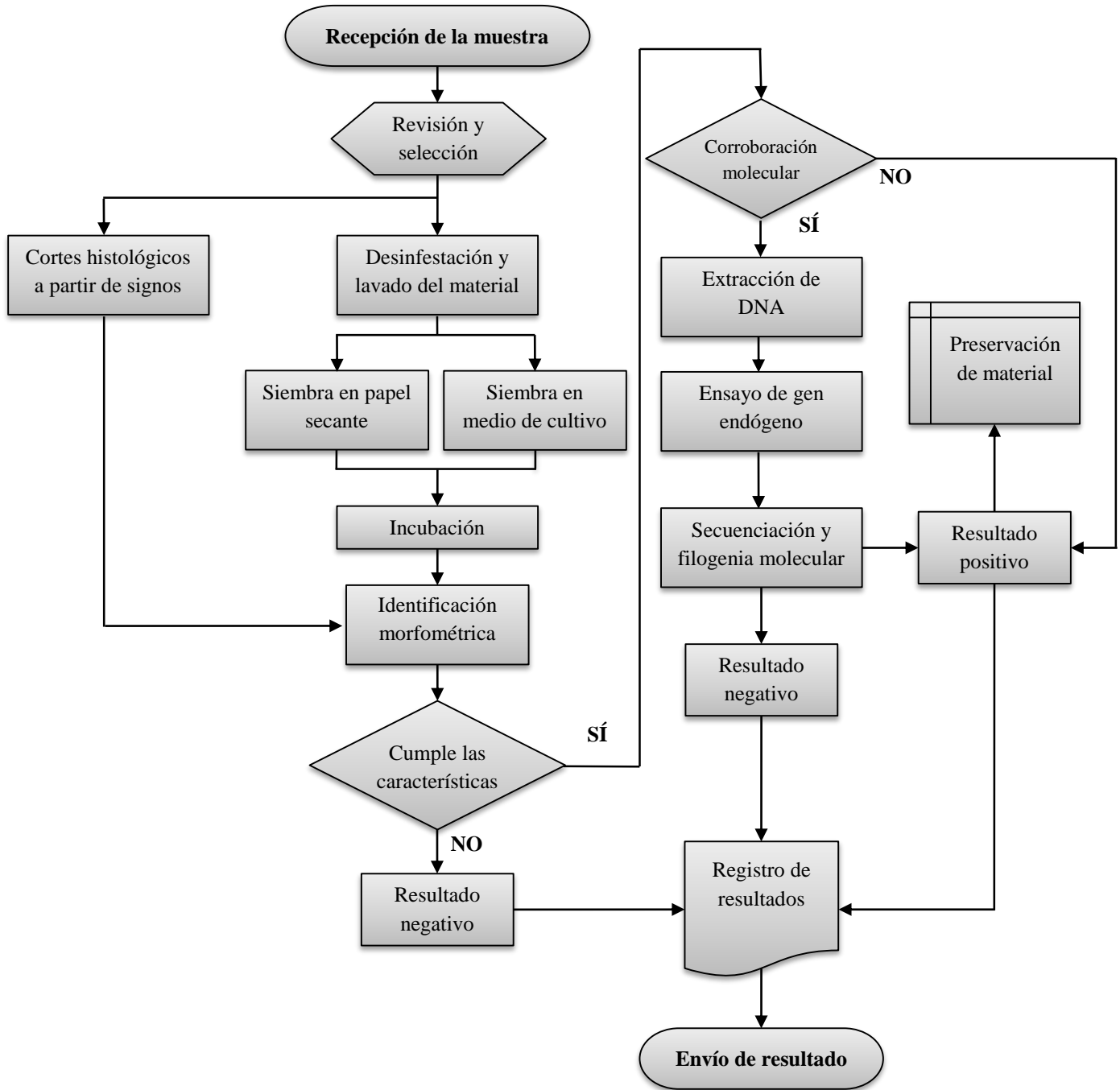
Familia: Mycosphaerellaceae

Género: *Septoria*

Especie: *Septoria lycopersici*

(Crous, Gams, Stalpers, Robert & Stegehuis, 2004)

2.3 Flujo de trabajo





3. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN

Para determinar la presencia de *S. lycopersici*, es necesario contar con material vegetal que presente signos y síntomas característicos de la enfermedad (Anexo 8.1). La muestra debe consistir en hojas y ramas de la planta que presenten manchas necróticas con puntuaciones oscuras (donde se pueden presentar los picnidios) o micelio alrededor del tejido.

Si la muestra no cumple con las características requeridas (como tejido vegetal distinto a hojas y ramas) o se encuentra en mal estado (fase avanzada de pudrición o descomposición), se registra el motivo del rechazo: “Material en mal estado” o “No se procesó”, y en observaciones se especifica brevemente la razón.

3.1 Identificación morfométrica

La identificación morfométrica se puede realizar por observación directa de cortes histológicos, a partir de signos en el tejido vegetal o del crecimiento de las estructuras en papel secante y medio de cultivo.

3.1.1 Cortes histológicos

- 1) Partir de hojas o ramas con presencia de síntomas, observar en un microscopio estereoscópico la presencia de signos del hongo (picnidios).
- 2) De los picnidios, obtener fragmentos menores a 0.5 mm de grosor utilizando navaja de bisturí o navaja de afeitar.
- 3) Elaborar montajes temporales o permanentes (Anexo 8.2) para su observación con un microscopio compuesto. Marcar las preparaciones con el número de identificación y los datos de la muestra.
- 4) Medir las estructuras del hongo (picnidios, conidios y células conidiógenas) y obtener el ancho y largo de éstos. Comparar las dimensiones obtenidas con la literatura de referencia, con la finalidad de definir el género y la especie de acuerdo a la descripción morfométrica (Sección 3.2).

3.1.1.1 Interpretación de resultados

En caso de que los signos en el tejido vegetal correspondan a picnidios y la observación de los mismos coincida con la descripción de *S. lycopersici*, se debe dar el resultado como positivo y, de ser necesario, se debe corroborar por secuenciación (Anexo 8.5).

Si no se detecta presencia de estructuras características de *S. lycopersici*, se debe reportar el diagnóstico para esta técnica como negativo y se debe verificar el resultado por las técnicas descritas en las secciones de incubación en papel secante (Sección 3.1.2) y aislamiento en medios de cultivo (Sección 3.1.3).



3.1.2 Incubación en papel secante

- 1) A partir de tejido vegetal con o sin síntomas del hongo, obtener fragmentos de aproximadamente 1 cm² y, en condiciones de asepsia, desinfectarlos con una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 1 min y enjuagar en 3 ocasiones con agua destilada estéril. Permitir el secado del material vegetal, para ello colocar los fragmentos sobre papel absorbente estéril durante un periodo aproximado de 2 a 3 horas.
- 2) Armar cámaras húmedas. Colocar en cajas Petri de cristal un círculo de papel filtro Whatman® del número 4 (se puede utilizar otro tipo de papel filtro o papel absorbente) y esterilizar en autoclave a 121 °C y 15 psi (libras por pulgada cuadrada, por sus siglas en inglés; = 103421 Pascales) durante 20 min, o a 160 °C durante 2 horas con calor seco. Una vez estériles y frías, humedecer el papel filtro con agua destilada estéril (evitar tener exceso de agua).
- 3) Colocar en la cámara húmeda de 5 a 6 fragmentos de material vegetal seco. Incubar a 25 °C, bajo condiciones cercanas al 100% de humedad, al menos durante 5 días.
- 4) Observar con un microscopio estereoscópico si hay la formación de picnidios del hongo, realizar el montaje para visualizar sus características.
- 5) A partir de las estructuras, obtener montajes temporales o permanentes para su observación con un microscopio compuesto. Medir las estructuras del hongo (picnidios, conidios y células conidiógenas) y obtener el intervalo de medidas del ancho y largo. Comparar las dimensiones con la literatura de referencia para definir el género y especie del hongo de acuerdo con las características morfométricas que presenten (Sección 3.2).

3.1.2.1 Interpretación de resultados

En caso de que los signos en el tejido vegetal correspondan a picnidios y la observación de los mismos coincida con la descripción de *S. lycopersici*, se debe reportar el diagnóstico para esta técnica como positivo y, de ser necesario (ver Sección 3.3), se debe corroborar por secuenciación (Anexo 8.5).

Si no se detecta presencia de estructuras características de *S. lycopersici*, se debe reportar el diagnóstico para esta técnica como negativo y verificar el resultado por la técnica descrita en la sección de aislamiento en medios de cultivo (Sección 3.1.3).

3.1.3 Aislamiento en medios de cultivo

- 1) A partir de tejido vegetal con presencia de síntomas, obtener fragmentos de aproximadamente 1 cm², los cuales se deben desinfectar y secar de acuerdo a lo indicado en la Sección 3.1.2. Si hay presencia de picnidios en el tejido vegetal, se deben diseccionar y sembrar directamente en el medio de cultivo.



- 2) Sembrar de 5 a 6 fragmentos secos en cajas Petri con uno de los siguientes medios de cultivo: EMA al 2% (Extracto de Malta Agar), PDA (Papa Dextrosa Agar) u OA (Harina de Avena Agar, por sus siglas en inglés), e incubar a $25\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ durante 5 días. Para la preparación de medios de cultivo, consultar el Anexo 8.4.
- 3) Si hay crecimiento de colonias típicas del hongo (Sección 3.2.1), se deben volver a aislar en medio de cultivo EMA, PDA u OA para obtener cultivos puros. Para ello, incubar de $15\text{ a }25\text{ °C}$ en 12 horas luz / 12 horas oscuridad durante 8 días; al término de este tiempo, observar el tipo de crecimiento, coloración del micelio y del medio de cultivo, además de la formación de estructuras del hongo (picnidios).
- 4) Obtener preparaciones temporales o permanentes de las estructuras (Anexo 8.2) y observar con un microscopio compuesto.
- 5) Medir las estructuras del hongo (picnidios, conidios y células conidiógenas) y obtener el intervalo y promedio del ancho y largo de estos. Comparar las dimensiones obtenidas con la literatura de referencia para definir el género y especie del hongo (Sección 3.2).

3.1.3.1 Interpretación de resultados

Para determinar la presencia del patógeno, se deben obtener colonias con desarrollo de picnidios con conidios característicos de *S. lycopersici*. Se debe reportar el resultado como positivo y, de ser necesario (ver Sección 3.3), se debe corroborar por secuenciación (Anexo 8.5).

Si no se detecta la presencia de colonias y estructuras características de *S. lycopersici*, se debe reportar el diagnóstico para esta técnica como negativo.

3.2 Descripción morfológica

La septoriosis del tomate presenta únicamente fase asexual, por lo que el diagnóstico morfológico debe estar basado en las características de los picnidios, conidios y células conidiógenas. Tanto *S. lycopersici* como *S. malagutii* pueden infectar diversas solanáceas, por lo que el diagnóstico debe considerar la diferenciación entre ambas especies (Cline & Rossman, 2006).

3.2.1 Descripción colonial

Colonias de crecimiento lento, de 31 mm de diámetro a los 15 días en PDA a 23 °C , micelio aéreo blanco que se torna subsecuentemente grisáceo pálido a ligeramente púrpura, de superficie flocosa (aspecto de copo) y ligeramente elevada. El reverso de la caja presenta coloración blanca a ligeramente color salmón (Figura 1A). *S. lycopersici* se diferencia de *S. malagutii* en morfología colonial porque este último en el reverso es ligeramente anillado y se pigmenta de color marrón vino a rojo en PDA (Figura 1B) (Cline & Rossman, 2006).

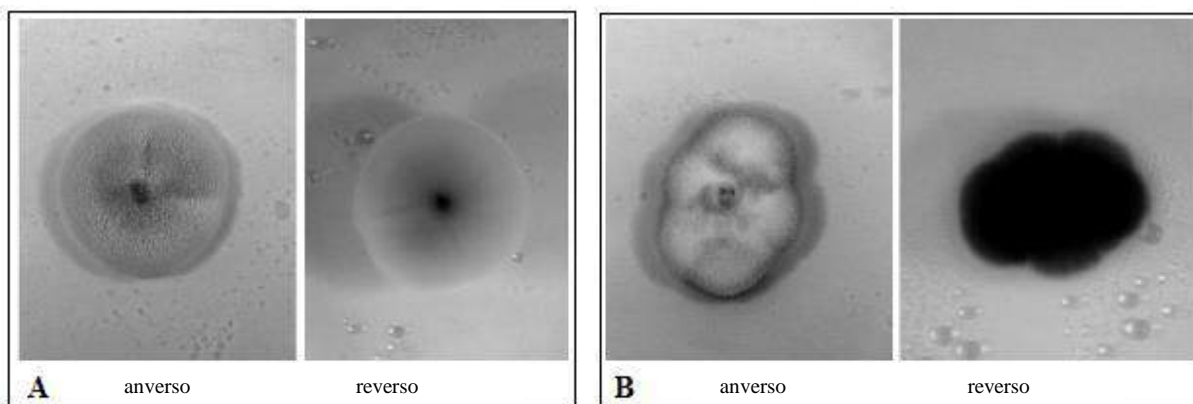


Figura 1. Morfología colonial de *Septoria*. Vista del anverso y reverso, respectivamente, del crecimiento del hongo en medio PDA a 23 °C durante 15 días. **A.** *Septoria lycopersici*. **B.** *Septoria malagutii* (Cline & Rossman, 2006).

3.2.2 Fase asexual (Anamorfo)

Existen ligeras diferencias en la descripción morfológica de *S. lycopersici* entre diversos autores, sobre todo en lo que respecta a las medidas de ancho y largo de conidios. Para fines de este protocolo, se citan los intervalos mayores. En general, *S. lycopersici* posee picnidios inmersos (epifilos o rara vez hipofilos), dispersos o en grupos de 6 a 8 anfígenos globosos a esféricos, de color amarillo miel a café oscuro, de 75 – 200 μm de diámetro (Figura 2A), con pared multicelular compuesta por una capa externa de células pseudoparenquimáticas de color amarillo miel de gran tamaño, pero de pared delgada y una región interna hialina de células pequeñas, ostiolo unilocular circular o ancho e irregular, hasta 90 μm de diámetro, completamente circular cuando es visto desde arriba (Sutton & Waterston, 1966; Muthumary, 1999).

Células conidiógenas ubicadas en la cavidad del picnidio, simples, de dos células lageniformes o ampuliformes, hialinas, no septadas, cilíndricas a clavadas y de 7.5–10 x 4 μm (Figura 2B), cada una de las cuales produce un conidio terminal solitario en su punta y, a menudo, también en proliferaciones simpodiales. Conidios blásticos, hialinos, filiformes y ligeramente curvos, de 2 a 12 septos, con ápice agudo, base truncada a obtusa, y de 52–105 x 2–3 μm (Figura 2C) (Sutton & Waterston, 1966; Muthumary, 1999). Respecto a *S. malagutii*, Cline & Rossman (2006) hacen énfasis que las células conidiógenas son más pequeñas ($7.4 \pm 0.2 \mu\text{m}$) comparadas con las de *S. lycopersici* ($9.1 \pm 0.3 \mu\text{m}$), mientras que los conidios de *S. malagutii* son más largos ($90.6 \pm 3.4 \mu\text{m}$) que los de *S. lycopersici* ($73.2 \pm 2.4 \mu\text{m}$).

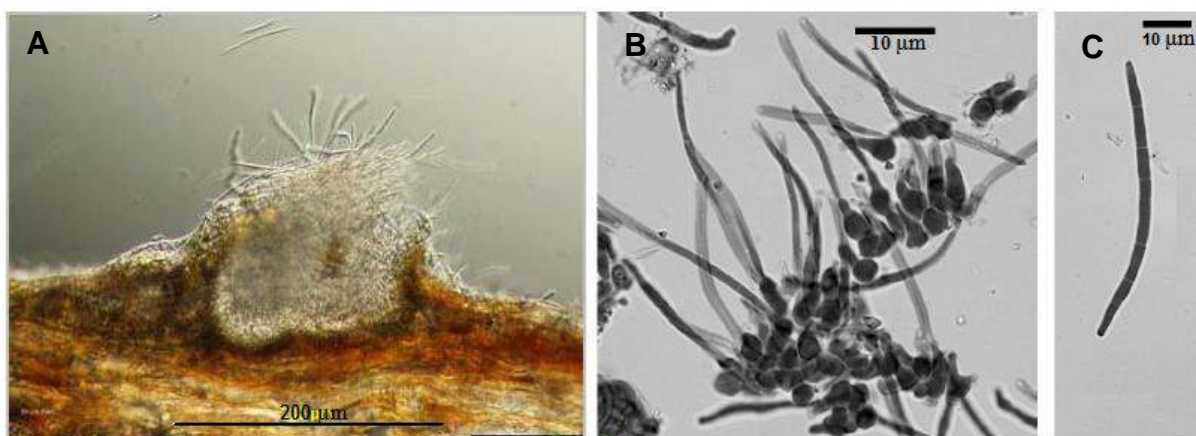


Figura 2. Estructuras de reproducción de *Septoria lycopersici*. A. Corte vertical de un picnidio sobre tejido vegetal. B. Células conidiógenas a 100X. C. Conidio a 63X. (A: Watt, s.f.; B y C: Cline & Rossman, 2006).

3.3 Identificación del patógeno

Para reportar una identificación positiva de *S. lycopersici*, es necesario la detección en conjunto de las siguientes pruebas: caracterización morfológica de las estructuras distintivas del hongo, aislamiento y tipificación de la colonia.

De ser necesario, como prueba de corroboración, se debe secuenciar el gen del factor de elongación de la traducción 1 alfa ($TEF-1\alpha$) y la región de los espaciadores transcritos internos (ITS) del DNA ribosómico (rDNA) (Verkley, Quaedvlieg, Shin y Crous, 2013), a partir de la extracción del ácido desoxirribonucleico (DNA) de cultivos puros. Los casos en los que se debe de corroborar por secuenciación son:

- Primeras detecciones en nuevos hospedantes.
- Cuando se necesite un sustento fitosanitario de mayor relevancia para la movilidad de tejido vegetal.

Los datos de secuenciación se deben de enviar al Laboratorio de Micología del CNRF para su análisis. En el Anexo 8.5 se detalla la metodología para el análisis empleada por el Laboratorio de Micología del CNRF. En estos casos, se considera aceptada la identificación después de realizar el análisis de secuencias.

4. REGISTROS

Almacenar los registros y evidencias del proceso de diagnóstico de *S. lycopersici*.

- Mantener el material vegetal que no fue utilizado en el diagnóstico en su empaque original a 4 °C durante, al menos, 1 mes posterior al diagnóstico.

En caso de obtener un resultado negativo:

- Inactivar y desechar el material vegetal.



En caso de obtener un resultado positivo:

- Desde el momento en que se detectan signos en hojas, prensar el tejido hasta que pierda humedad y resguardar a temperatura ambiente.
- Conservar montajes permanentes donde se encuentren estructuras distintivas del hongo como evidencia de la identificación morfológica.
- Conservar el aislamiento puro mediante técnicas de preservación que garanticen la viabilidad del hongo, no realizar transferencias continuas del aislamiento.
- Resguardar los resultados de las pruebas moleculares (fotografía del gel y secuencias).
- Mantener el DNA obtenido en congelación a -20 °C (de ser posible a -70 °C).

5. CONTACTO PARA INFORMACIÓN ADICIONAL

Correo: lab.micologia@senasica.gob.mx

Teléfono: 011 (52) 55 5905 1000, **Ext.** 51424, 51409 y 51373

6. RECONOCIMIENTO

Este protocolo fue elaborado por el Laboratorio de Micología (Adrián González Saucedo, Jire Ajeleth Muñoz Jaimes, Lervin Hernández Ramos, Magnolia Moreno Velázquez y Nayeli Carrillo Ortiz); revisado por el Departamento de Fitopatología (María del Rocío Hernández Hernández) y el Grupo DiaFi (Berenice Calderón Pérez); y editado por el Grupo DiaFi (Ariana Guadalupe Robles Zárate).

7. REFERENCIAS

- Bassay Blum, L. E. (2000). Reduction of incidence and severity of *Septoria lycopersici* leaf spot of tomato with bacteria and yeasts. *Ciência Rural, Santa María*, 30 (5): 761-765.
- Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J. & Sayers, E. W. (2013). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 41: 36-42. doi:10.1093/nar/gks1195
- Bush, E. (2010). *Septoria Leaf Spot (Septoria lycopersici)* [Figura]. Recuperado en agosto de 2019 de <https://www.invasive.org/browse/detail.cfm?imgnum=5411325>
- Cabral, R. N., Marouelli, W. A., Lage, D. A. & Café-Filho, A. C. (2013). Septoria leaf spot in organic tomatoes under diverse irrigation systems and water management strategies. *Horticultura Brasileira*, 31: 392-400.
- Cenis, L. J. (1992). Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Research*, 20: 2380. doi: 10.1093/nar/20.9.2380



- Cline, E. T. & Rossman, A. Y. (2006). *Septoria malagutii* sp. nov., cause of annular leaf spot of potato. *Mycotaxon*, 98: 125-135.
- Crous, P. W., Gams, W., Stalpers, J. A., Robert, V. & Stegehuis, G. (2004). MycoBank: an online initiative to launch mycology into the 21st century. *Studies in Mycology*, 50: 19–22.
- Ferrandino, F. J. & Elmer, W. H. (1992). Reduction in tomato yield due to *Septoria* Leaf Spot. *Plant Disease* 76 (2): 208-211.
- Kennedy, B. (2016). *Septoria Leaf Spot (Septoria lycopersici)* [Figura]. Recuperado en agosto de 2019 de <https://www.invasive.org/browse/detail.cfm?imgnum=5544140>
- MacNeill, B. H. (1950). Studies in *Septoria lycopersici* Spg. *Canadian Journal of Research*, 28: 645-672.
- Manchester KL. (1995). Value of A_{260}/A_{280} ratios for measurement of purity of nucleic acids. *BioTechniques* 19 (2): 208-210.
- Muthumary, J. (1999). First contribution to a monograph of *Septoria* species in India. Chennai, India: Universidad de Madrás.
- O'Donnell, K., Kistler, H. C., Cigelnik, E. & Ploetz, R. C. (1998). Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 95: 2044-2049.
- SIAP. Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2017). Anuario Estadístico de la Producción Agrícola [versión electrónica]. Recuperado el 03 de junio del 2019 de <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Sutton, B. C. & Waterston, J. M. (1966). *Septoria lycopersici*. *Commonwealth Mycological Institute Descriptions of pathogenic fungi and bacteria*, 89: 1-2.
- Verkley, G. J. M., Quaadvlieg, W., Shin, H.-D. & Crous, P. W. (2013). A new approach to species delimitation in *Septoria*. *Studies in Mycology*, 75: 213–305. doi:10.3114/sim0018
- Watt, B. (2014). *Septoria Leaf Spot on garden tomato (Solanum lycopersicum)* [Figura]. Recuperado en agosto de 2019 de <https://www.invasive.org/browse/detail.cfm?imgnum=5507223>
- Watt, B. (s.f.). *Une pycnide mature de Septoria lycopersici, de nombreuses conidies ont été formées. (septoriose, Septoria leaf spot)* [Figura]. Recuperado en agosto de 2019 de <http://ephytia.inra.fr/fr/C/21336/Di-gno-Leg-Pycnides>
- White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S. B. & Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sminky & T. J. White (Eds.), *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. (pp. 315-322). Cambridge, Estados Unidos: Academic Press.
- Zitter, T. A. (1987). *Septoria Leaf Spot of Tomato (Septoria lycopersici)* Fact Sheet [version electrónica]. *Vegetable MD Online*, 735.80. Recuperado en agosto de 2019 de http://vegetablemdonline.ppath.cornell.edu/factsheets/Tomato_Septoria.htm



Forma recomendada de citar:

SENASICA. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2019).
Protocolo de Diagnóstico: *Septoria lycopersici* (Mancha foliar o Septoriosis del tomate)
[Versión 1.0]. Tecámac, México: Autor.

8. ANEXOS

8.1 Signos y síntomas

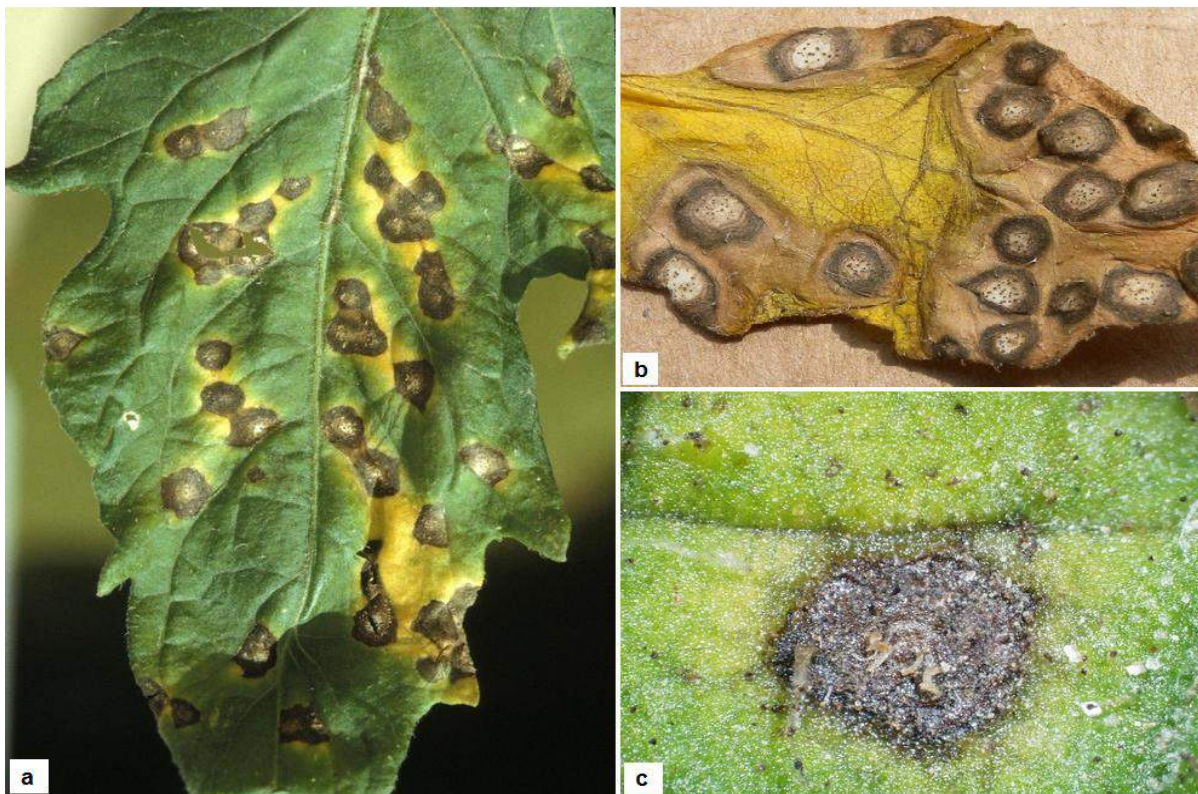


Figura 3. Signos y síntomas de *Septoria lycopersici* en tomate. a. Manchas anulares con clorosis marginal en haz de la lámina foliar. b. Presencia de picnidios. c. Masa de esporas (cirros) exudados de un picnidio (a: Watt, 2014; b: Kennedy, 2016; c: Bush, 2010).

8.2 Elaboración de montajes

8.2.1 Preparaciones temporales con cubreobjetos

- 1) Partir de tejido vegetal con signos del hongo o de cultivos puros. Colocar el tejido vegetal o estructuras en un portaobjeto o caja Petri de cristal sobre la platina del microscopio estereoscópico para observar a detalle el área a seccionar o montar en laminillas.
- 2) Realizar cortes del material vegetal con estructuras del hongo, con navaja de bisturí o con navaja de afeitar, de un grosor menor a 0.5 mm o lo suficientemente delgado para dejar pasar la luz a través del tejido; también se puede tomar directamente un fragmento de micelio o las estructuras del hongo a partir del tejido vegetal o cultivo del hongo.
- 3) Colocar los cortes o estructuras del hongo sobre un portaobjetos con la ayuda de una aguja de disección o de un alfiler entomológico. Adicionar una gota de medio de montaje (Anexo 8.3) e hidratar completamente el tejido evitando la formación de burbujas de aire.



- 4) Cubrir la gota con un cubreobjetos y presionar ligeramente para que se distribuya la gota y, en su caso, sustraer el líquido excedente. Secar con papel absorbente cuidando que no se pierda el espécimen. Calentar por algunos segundos para eliminar burbujas de aire. Observar el espécimen en un microscopio compuesto. En caso de que no se aprecien las estructuras, se debe realizar otra preparación, cuidando de que los cortes sean más finos.

8.2.2 Preparaciones temporales con cinta adhesiva

- 1) Colocar en un portaobjetos una gota de medio de montaje (Anexo 8.3).
- 2) Con un pedazo de cinta adhesiva transparente, tocar con delicadeza y en forma superficial el área del tejido vegetal, o del medio de cultivo con crecimiento de hongos para obtener las estructuras del mismo.
- 3) Pegar la cinta sobre el portaobjetos cuidando que las estructuras queden dentro de la gota.
- 4) Observar con un microscopio compuesto, medir las estructuras (picnidios, conidios y células conidiógenas), obtener el intervalo y promedio del ancho y largo de éstos.

8.2.3 Preparaciones permanentes

- 1) Colocar una gota de medio de montaje (Anexo 8.3) sobre un portaobjetos.
- 2) Adicionar las estructuras del hongo dentro de la gota con ayuda de una aguja de disección o de un alfiler entomológico. Eliminar las burbujas que se formen con una aguja o calentado el portaobjetos.
- 3) Con ayuda de un sacabocados, formar un anillo de parafina alrededor de la gota. Para esto, calentar el extremo del sacabocados en un mechero e introducirlo en parafina sólida e inmediatamente colocarlo alrededor de la gota.

Nota: el diámetro del sacabocados debe ser mayor al de la gota.

- 4) Colocar un cubreobjetos sobre el anillo de parafina y calentar hasta que el anillo se derrita, cuidando que no queden burbujas de aire en la gota ni en la parafina.
- 5) Dejar enfriar y observar con un microscopio compuesto.

8.3 Medios de montaje

Lactofenol

Fenol (cristales)	20 g
Ácido láctico	20 mL
Glicerina	40 mL
Agua destilada	20 mL
Azul de Nilo	0.1- 0.5 g
<i>Versión 1.0</i>	[13]



Procedimiento: agregar los cristales de fenol y el agua a un recipiente, calentar ligeramente para disolver los cristales, y adicionar la glicerina y el ácido láctico. Colocar el colorante y agitar hasta que se diluya (la cantidad de colorante depende de la coloración deseada).

Nota: este medio de montaje actúa como solución fijadora y restaura la turgencia del material seco. Es excelente medio para montajes temporales y permanentes.

Agua- glicerina

Glicerina	50 mL
Agua destilada	50 mL

Procedimiento: mezclar 50 partes de agua destilada y 50 partes de glicerina. Se puede adicionar algún colorante como azul de Nilo.

Nota: se utiliza en montajes temporales y permanentes.

8.4 Medios de cultivo

A continuación, se señalan los medios de cultivo que permiten un óptimo desarrollo *in vitro* de *S. lycopersici*.

Extracto de Malta Agar 2% (EMA)

Extracto de Malta Agar	16.8 g
Agua destilada	500 mL

Procedimiento: mezclar los ingredientes en un matraz Erlenmeyer de 1 L, esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 min. Vaciar en cajas Petri y dejar solidificar.

Harina de Avena Agar (OA)

Hojuelas de avena	20 g
Bacto Agar (agarosa granulada)	7.5 g
Agua destilada	500 mL

Procedimiento: moler las hojuelas de avena en licuadora y mezclar con el resto de los reactivos en un matraz Erlenmeyer de 1 L. Esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 min, vaciar en cajas Petri y dejar solidificar.

PDA (Papa Dextrosa Agar) con ácido láctico

Papa	100 g
Dextrosa	7.5 g
Agar nutritivo	9.0 g
Agua destilada	500 mL



Procedimiento: colocar los trozos de papa en un matraz Erlenmeyer con el agua y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 20 min. Filtrar el agua de cocción y aforar a 500 mL. Agregar la dextrosa y el agar, disolver con agitador magnético. Esterilizar en autoclave a 121 °C por 20 min. Dejar enfriar. Adicionar 1.5 mL de ácido láctico al 10%, vaciar en cajas Petri y dejar solidificar.

8.5 Corroboración mediante secuenciación

Para determinar la identidad de *S. lycopersici* mediante secuenciación y filogenia molecular, es necesario secuenciar el gen del factor de elongación de la traducción 1 alfa (TEF-1 α) y una región de los espaciadores transcritos internos (ITS) del rDNA. De acuerdo a lo reportado por Verkley, Quaedvlieg, Shin y Crous (2013), el uso de ambos genes es necesario en el diagnóstico de *S. lycopersici*, dado que el gen TEF-1 α permite separar a *S. lycopersici* y *S. malagutii* de entre más de 90 especies del género *Septoria*; mientras que la región ITS permite separar entre ambas especies.

8.5.1 Extracción de DNA

La extracción se debe realizar a partir de cultivos puros en medio PDA, OA o EMA, previamente caracterizados morfológicamente.

Nota: cualquier kit comercial de extracción puede resultar óptimo para tal fin, para ello es importante obtener una buena calidad, cantidad e integridad de DNA.

Se sugiere la metodología propuesta por Cenis (1992) modificada, se describe a continuación:

- 1) En un tubo con perlas de cerámica (MagNA Lyser Green Beads) transferir 0.01 g de micelio de una caja Petri de la muestra de interés.

Nota: para facilitar la obtención de sobrenadante, previamente sustraer del tubo un poco menos de la mitad de las perlas de cerámica. Otra opción, es duplicar el volumen de los reactivos que se mencionan a continuación.

- 2) Agregar 500 μ L de buffer TE 1X, incubar a temperatura ambiente durante 5 min. Posteriormente, centrifugar 5 min a 17 940 g y extraer la mayor cantidad posible de sobrenadante con una micropipeta.

Nota: no decantar el buffer TE mediante inversión del tubo, ya que las perlas de cerámica y micelio se perderían.

- 3) Adicionar 300 μ L de buffer de extracción y macerar el micelio hasta que quede pulverizado usando un disruptor de tejidos durante 10 min (Minibeadbeater-96 Cat. No. 1001 de Biospect Products o equipos con características similares).



Nota: el buffer de extracción consiste en 200 mM Tris-HCL pH 8.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA (Ácido Etilendiaminotetraacético) y 0.5% SDS (Dodecil Sulfato de Sodio).

- 4) Adicionar 150 μ L de acetato de sodio 3 M pH 5.2, invertir suavemente dos a tres veces el tubo. Posteriormente, incubar a una temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 min.
- 5) Centrifugar los tubos durante 10 min a 15 290 g, transferir 250 μ L del sobrenadante a un tubo de 1.5 mL nuevo y estéril (evitar la resuspensión del sedimento).
- 6) Agregar 250 μ L de isopropanol frío (almacenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), invertir suavemente dos a tres veces el tubo y dejar reposar a temperatura ambiente durante 10 min. Posteriormente, centrifugar 10 min a 15 290 g.

Nota: al final del proceso puede ser o no visible la pastilla de DNA.

- 7) Decantar el isopropanol por inversión cuidando de no perder la pastilla. Agregar 500 μ L de etanol al 70% y centrifugar durante 2 min a 15 290 g. Secar la pastilla por inversión en papel secante estéril hasta que no se observen gotas en la pared del tubo.
- 8) Resuspender el DNA en 50 μ L de agua grado biología molecular o buffer TE 1X, y guardar la muestra a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. La cantidad de DNA obtenida por este método debe ser la suficiente para cubrir el intervalo de trabajo del ensayo de PCR.

8.5.2 Verificación de la calidad del DNA

Al finalizar el proceso es importante verificar la calidad y cantidad del DNA obtenido. Para ello, se puede utilizar un espectrofotómetro modelo NanoDrop 2000c de Thermo Scientific™ (seguir las instrucciones del manual del fabricante para su uso) u otro equipo con la misma funcionalidad. La calidad óptima del DNA está dada por la absorbancia $A_{260/280} = 1.8-2.0$ y $A_{260/230} = 2.0-2.2$ (Manchester, 1995). En la práctica, absorbancias fuera de los intervalos óptimos son permitidos siempre que amplifiquen exitosamente los fragmentos de interés del control endógeno.

8.5.3 Ensayo de PCR punto final

Se debe amplificar el gen TEF-1 α con los primers diseñados por O'Donnell, Kistler, Cigelnik y Ploetz (1998), y la región ITS del rDNA con los primers propuestos por White, Lee y Taylor (1990). Las secuencias de ambos pares de primers se detallan en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Primers utilizados en el ensayo de PCR punto final para la amplificación de genes endógenos

Tipo	Nombre del primer	Secuencia (5'→3')	Tamaño (pb)
Sentido	EF-1	5'- ATGGGTAAGGARGACAAGAC -3'	≈ 750
Antisentido	EF-2	5'-GGARGTACCAGTSATCATGTT -3'	
Sentido	ITS-1	5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG -3'	≈ 650
Antisentido	ITS-4	5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC -3'	

- 1) Preparar la mezcla de reacción de manera separada para cada par de primers de acuerdo a lo descrito en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Preparación de la mezcla de reacción para el ensayo de PCR punto final

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (μL)
Buffer PCR	10 X	1 X	2.5
MgCl₂	50 mM	1.5 mM	0.75
dNTP's	10 mM	0.2 mM	0.5
Primer Sentido	10 μM	0.5 μM	1.25
Primer Antisentido	10 μM	0.5 μM	1.25
Taq DNA Pol	500 U	2.5 U	0.125
DNA	12.5 – 250 ng/μL	1 – 20 ng/μL	2.0
Agua grado biología molecular	-	-	16.625
		Volumen final	25

- 2) A continuación, programar el termociclador de acuerdo a las condiciones descritas en el Cuadro 3 para el gen TEF-1α, y en el Cuadro 4 para la región ITS.

Cuadro 3. Programa del termociclador para la amplificación del gen TEF-1α

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	5 min	1
Desnaturalización	95 °C	30 s	35
Alineamiento	50 °C	30 s	
Extensión	72 °C	60 s	
Extensión final	72 °C	5 min	

Cuadro 4. Programa del termociclador para la amplificación de la región ITS

Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	3 min	1
Desnaturalización	95 °C	45 s	35
Alineamiento	58 °C	45 s	
Extensión	72 °C	45 s	
Extensión final	72 °C	10 min	1

3) Realizar el análisis electroforético de los productos de PCR durante 1 hora a 100 V en un gel de agarosa ultra pura al 2% en buffer TAE 1X, teñido con 0.6X de GelRed™ Biotum, u otro método adaptable que permita interpretar los resultados.

8.5.4 Controles para las pruebas moleculares

En ambos ensayos de PCR punto final descritos en este protocolo, es necesario incluir los siguientes controles:

Control positivo: provee un patrón de referencia con el cual comparar los resultados positivos en las muestras. Puede ser DNA genómico de cualquier hongo, que en un ensayo previo de gen endógeno haya tenido una amplificación correcta.

Control negativo de reactivos: es la mezcla de reacción sin molde (DNA/RNA/clona). Para el caso de genes endógenos descarta contaminación de la reacción.

8.5.5 Interpretación de resultados de los ensayos de PCR punto final

Los resultados son válidos solamente bajo los siguientes criterios:

- En ambos ensayos de amplificación de genes, el control positivo (DNA) y cada una de las muestras deben generar una banda de tamaño aproximado entre 650 a 800 pb para el caso de TEF-1 α , y entre 500 a 700 pb para la región ITS.
- El control negativo de reactivos no debe de generar bandas en ningún ensayo de PCR.

8.5.6 Secuenciación y filogenia molecular

- 1) Los productos de PCR se deben secuenciar siguiendo las especificaciones para el envío de muestras de la institución a la que se solicite el servicio.
- 2) Una vez que se cuente con las secuencias, ingresar a la herramienta de alineamiento **Nucleotide BLAST** (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (National Center for Biotechnology Information), disponible en <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Insertar la secuencia de interés y realizar el alineamiento con los parámetros predeterminados.

- 3) Una vez realizado el alineamiento, revisar cuidadosamente las especies que aparecen en la parte superior de la tabla. Se debe verificar el porcentaje de cobertura e identidad (valores con tendencia al 100%) y el valor de E, el cual representa el valor estadístico generado por BLAST a partir del alineamiento al azar de la secuencia de interés en la base de datos, dicho valor debe presentar una tendencia hacia el cero (Benson et al., 2013).

Dado que en grupos de especies con un alto grado de parentesco molecular la diferenciación entre especies, formas especiales o razas, reside en un número limitado de inserciones y deleciones (INDEL) y polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), es conveniente realizar un análisis filogenético para determinar con exactitud la identidad de las muestras de interés. La reconstrucción filogenética debe partir de secuencias bien caracterizadas de especies tipo y procedentes de una fuente fiable, se recomienda utilizar las secuencias de referencia publicadas por Verkley et al., (2013) para los genes TEF-1 α e ITS, y agregar las secuencias de la muestra de interés para llevar a cabo la filogenia.

Nota: el número de acceso de la base de datos del **GenBank** de las secuencias de referencia para *S. lycopersici* son: KF253410 y KF253411 para el gen TEF-1 α , y KF251462 y KF251463 para la región ITS.

- 4) El alineamiento múltiple de secuencias y la posterior construcción de árboles filogenéticos se realizan con los softwares BioEdit Sequence Alignment Editor v7.2.5 y MEGA7, respectivamente (otros softwares pueden ser utilizados para el mismo propósito).

En el alineamiento múltiple de secuencias, incluir tanto la secuencia del primer sentido como del antisentido en su inverso complementario (secuencia consenso). Utilizar el algoritmo ClustalW para el alineamiento de todas las secuencias. Para la reconstrucción filogenética es recomendable utilizar un método que esté basado en métodos probabilísticos (Máxima Verosimilitud o Inferencia Bayesiana). El resultado obtenido en el árbol filogenético puede ser confirmado mediante el análisis de los INDEL y SNP observados directamente en el alineamiento múltiple de secuencias.

8.5.7 Interpretación de resultados

El resultado es positivo cuando la secuencia de la muestra queda agrupada exactamente en el clado 4A de Verkley et al., (2013), junto con las secuencias de referencia KF253410 y KF253411 para el gen TEF-1 α (Figura 4); además, el alineamiento múltiple con las secuencias KF251462 y KF251463 para la región ITS debe ser homólogo (Figura 5).

El resultado es negativo cuando la secuencia de la muestra queda agrupada en un clado distinto a las de las secuencias de referencia. En este caso, la identidad del organismo es establecida con base en el clado con que se agrupe la secuencia de la muestra y debe registrarse en el resultado final.

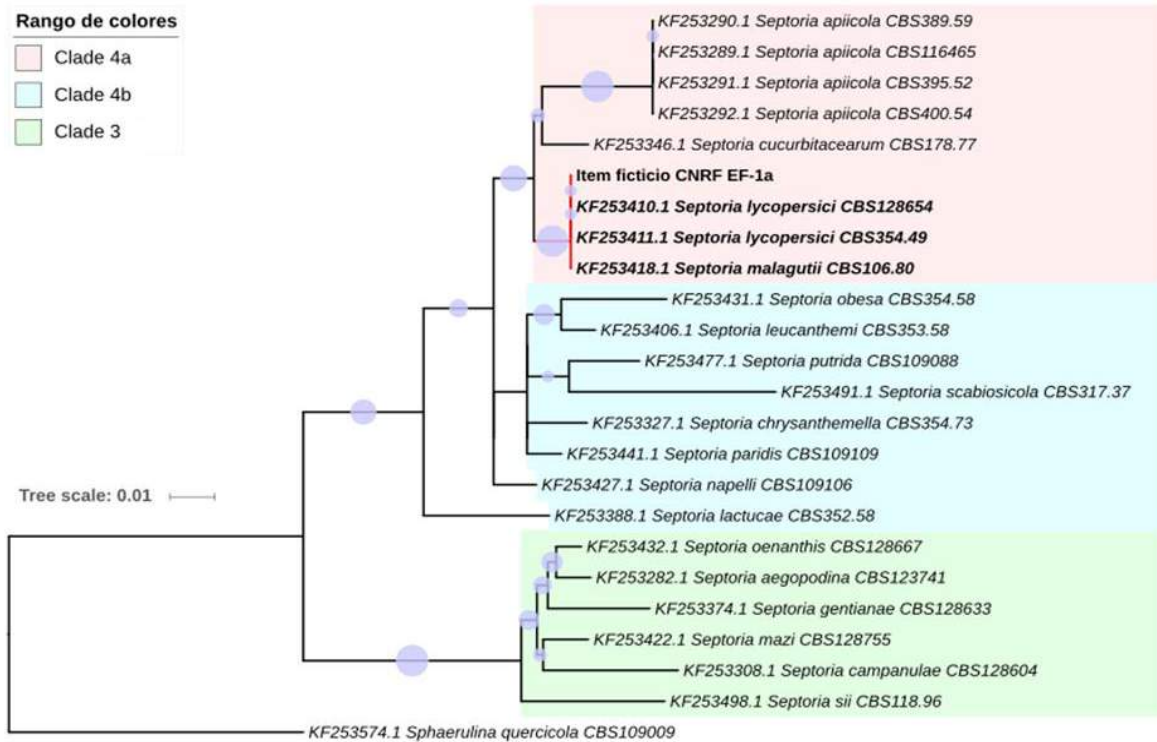


Figura 4. Filogenia molecular del género *Septoria*. Inferencia de una porción del gen TEF-1 α mediante el método de Máxima Verosimilitud (Maximum likelihood) basado en el modelo Tamura Nei con 1000 réplicas soporte (Bootstrap). Se muestra el árbol con la mayor probabilidad de registro, los valores soporte $\geq 50\%$ están simbolizados en los internodos con un círculo azul. Se usaron secuencias de los grupos 3, 4a y 4b propuestos por Verkley et al., (2013). Se incluye además la muestra denominada aislamiento CNRF. Se utiliza a *Sphaerulina quercicola* como nodo raíz externo al grupo.

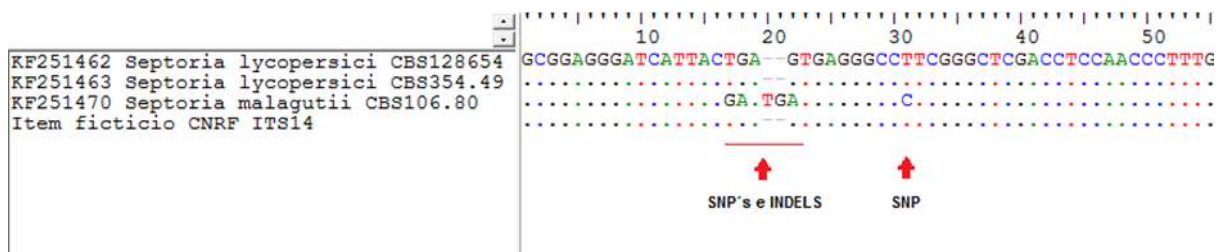


Figura 5. Alineamiento múltiple de secuencias. Se utilizan las secuencias de la región ITS del rRNA de *Septoria lycopersici* y *Septoria malagutii* con el algoritmo ClustalW; además, se incluye la muestra denominada ítem CNRF. Se indican los INDEL y SNP característicos para diferenciar entre ambas especies a partir del nucleótido 17 de la región ITS del rRNA.