

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD XOCHIMILCO  
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA Y ANIMAL  
LICENCIATURA EN AGRONOMÍA

SERVICIO SOCIAL

**"EVALUACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS PARA LA IDENTIFICACIÓN  
POR PCR EN PUNTO FINAL DE PLAGAS DE INTERÉS AGRÍCOLA"**

PRESTADOR DEL SERVICIO SOCIAL:

PAULINA GONZÁLEZ PEREA

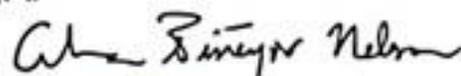
MATRÍCULA: 2152031995

ASESOR INTERNO:

DRA. ALMA AMPARO PIÑEYRO NELSON

NÚMERO ECONÓMICO: 39484

FIRMA:

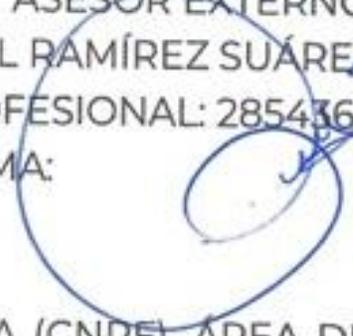


ASESOR EXTERNO:

ING. ÁNGEL RAMÍREZ SUÁREZ

CÉDULA PROFESIONAL: 2854367

FIRMA:



LUGAR DE REALIZACIÓN:

CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA FITOSANITARIA (CNR), ÁREA DE SECUENCIACIÓN Y BIOINFORMÁTICA. CARRETERA FEDERAL MÉXICO-PACHUCA KM 37.5, TECÁMAC, ESTADO DE MÉXICO C.P. 55740.

FECHA DE INICIO: 1 JULIO 2022

FECHA TÉRMINO: 6 MARZO 2023

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
FUNDAMENTO TEÓRICO .....	2
PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA).....	2
EQUIPOS PARA PCR .....	2
OLIGONUCLEÓTIDOS (PRIMERS O CEBADORES).....	3
GEN 18S .....	4
SECUENCIACIÓN SANGER (MÉTODO SANGER O DE TERMINACIÓN DE LA CADENA) .....	4
PLAGAS DE INTERÉS ESTUDIADAS EN ESTE SERVICIO SOCIAL .....	4
HONGOS.....	4
• <i>Phytophthora capsici</i> Leonian (Tizón o marchitez del pimiento). .....	4
• <i>Fusarium oxysporum</i> (Pudrición radical).....	5
INSECTOS.....	5
• <i>Grapholita molesta</i> (Palomilla oriental de la fruta). .....	5
MALEZAS.....	5
• <i>Commelina benghalensis</i> Leonian (Hierba de pollo). .....	5
NEMÁTODOS .....	5
• <i>Meloidogyne chitwoodi</i> (nemátodo agallador de la papa) .....	5
JUSTIFICACIÓN .....	6
OBJETIVOS .....	6
OBJETIVO GENERAL .....	6
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	7
MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
LOCALIZACIÓN .....	7
MATERIAL GENÉTICO .....	7
OLIGONUCLEÓTIDOS.....	8
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	8
PCR.....	9
PRIMERS UF1 – UR1.....	11
PRIMERS UF2 – UR2 .....	12
RESULTADOS.....	13
MUESTRAS DE DNA .....	13
RESULTADOS DE PCR EN QIAXCEL .....	14

PRIMERS UF1 – UR1.....	14
PRIMERS UF2 – UR2.....	15
MUESTRA QUE SE LE REALIZÓ SECUENCIACIÓN SANGER.....	15
RESULTADOS DE SECUENCIACIÓN.....	16
IMAGEN DE LA SECUENCIA DENTRO DE NCBI.....	16
COMPARACIÓN DE RESULTADOS EN NCBI.....	17
DETERMINACIÓN DE IDENTIDAD A NIVEL ESPECIE MEDIANTE BLAST.....	17
METAS.....	18
METAS.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.....	19
LITERATURA CITADA.....	20
ANEXO DE EVIDENCIAS.....	23

## INTRODUCCIÓN

Las plagas y enfermedades agrícolas no sólo reducen la producción agrícola, sino que también afectan la calidad de los cultivos, lo cual supone grandes repercusiones sobre el sector productor. Una de las medidas para hacer frente a las afectaciones producidas por las plagas y enfermedades es una detección temprana y precisa del organismo que está ocasionando un daño (SIAP, 2016), aún en organismos asintomáticos o con afectaciones leves. En México, la amplia disposición de hospederos susceptibles a ser infectados por diversas plagas y enfermedades, permiten prever que estas especies pueden representar a corto plazo una importante amenaza fitosanitaria. Por lo tanto, contar con un diagnóstico preciso y oportuno será crítico en la prevención de la invasión de estas especies.

Actualmente en diversos cultivos de interés económico, se tienen bajo vigilancia 5 plagas identificadas como de alto riesgo, por parte del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (Senasica), entre las que se encuentran las especies de hongos *Phytophthora capsici* y *Fusarium oxysporum*, insectos *Grapholita molesta*, malezas *Commelina benghalensis* y nemátodos *Meloidogyne Chitwoodi*.

Derivado de la importancia de las plagas y enfermedades agrícolas antes mencionadas, su detección y/o diagnóstico tiene una gran repercusión para la implementación de las medidas adecuadas para su manejo o control. En los últimos años, los avances en la biología molecular han permitido desarrollar métodos de identificación y caracterización de plagas y enfermedades basados en el uso de marcadores moleculares aún en organismos asintomáticos o con afectaciones leves.

Diversos marcadores moleculares pueden ser utilizados en la evaluación de presencia de la plaga durante cualquier etapa de desarrollo, son aplicables a cualquier tipo de matriz y permiten la identificación correcta de la especie sin necesidad de caracteres morfotaxonómicos (Azofeita-Delgado, 2006).

Los métodos moleculares se han convertido en una herramienta eficiente para confirmar la identidad de especies, en particular desde la implementación del uso de oligonucleótidos específicos que amplifican una región particular del genoma del organismo blanco. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue identificar molecularmente por medio de PCR y posterior secuenciación Sanger algunas especies de plagas

proporcionadas por los diferentes laboratorios pertenecientes al Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF) de la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agropecuaria (SENASICA).

## FUNDAMENTO TEÓRICO

### PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente (Tamay De Dios, Ibarra & Velasquillo, 2013). Aprovechando la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células (Tamay de Dios, Ibarra & Velasquillo, 2013).

Esta tecnología utiliza secuencias de oligonucleótidos que inician la síntesis de fragmentos de ADN de longitudes variables (Azofeita-Delgado, 2006). La PCR se basa en la replicación celular en la que actúan varias proteínas para sintetizar dos nuevas hebras de ADN a partir de otra que funciona como molde (Serrato *et al.*, 2014).

En la PCR se simula en un tubo lo que ocurre durante la replicación celular. La síntesis de nuevas cadenas de ADN se lleva a cabo mezclando: el ADN que contiene el o los fragmentos que se van a amplificar; la polimerasa; los iniciadores u oligonucleótidos (fragmento de ADN de 15-30 nucleótidos que flanquean la región a amplificar y que aportan el extremo 3' libre para que inicie la transcripción); desoxinucleótidos (dNTPs); cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ) u otro cofactor necesario para que trabaje la polimerasa y una solución amortiguadora que mantenga el pH apropiado para que se lleve a cabo la síntesis. Esta mezcla se somete a la repetición de varios ciclos a diferentes temperaturas (ciclo de PCR) (Serrato *et al.*, 2014).

Como paso previo a la reacción de la PCR-RT. Las bacterias con altos niveles de ARNr (alto número de ribosomas) son generalmente las más activas desde el punto de vista funcional (Calderón, 2018).

### EQUIPOS PARA PCR

Los equipos en donde se realiza la reacción de PCR son llamados termocicladores, los cuales están diseñados para establecer un sistema homogéneo en donde las condiciones de temperatura y tiempo

necesarios no se modifiquen en cada uno de los ciclos. Al final de la reacción, para corroborar si se amplificó la secuencia blanco de interés, los productos de la PCR o también llamados amplicones son analizados en geles de agarosa o equipos de primera generación para confirmar si la reacción fue exitosa (Tamay De Dios, Ibarra & Velasquillo, 2013). Los productos de la reacción se separan por electroforesis en gel de agarosa (Ongay-Larios & Códiz, 2021). En este trabajo se utilizó el equipo de primera generación QIAxcel el cual analiza fragmentos de ADN por medio de electroforesis capilar sensible de alta resolución.

Un amplicón se refiere a un conjunto de moléculas de ADN idénticas que resulta de una PCR que da lugar a la producción de diferentes copias de ese fragmento. Es esencialmente un clon molecular (Claros, Saladrigas & González, 2004). Los productos de la PCR o amplicones están representados mediante bandas de un tamaño específico y se comparan con un marcador de peso molecular conocido para determinar la especificidad de la reacción (Tamay De Dios, Ibarra & Velasquillo, 2013).

#### OLIGONUCLEÓTIDOS (PRIMERS O CEBADORES)

Los oligonucleótidos también llamados primers o cebadores, tienen una función específica la cual es la detección e identificación de genes específicos partiendo de secuencias completas disponibles en el GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Los oligonucleótidos delimitan la zona de ADN a amplificar al ser reconocidos por la enzima y permiten iniciar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; replicación *in vitro*). Ambos iniciadores deben tener una temperatura de fusión ( $T_m$ ) similar ( $T_m$ , por sus siglas en inglés Melting Temperature), la  $T_m$  de una secuencia de DNA se refiere a la temperatura a la cual 50% de las copias de esa secuencia presentes en una reacción se encuentra en forma monocatenaria y 50% en forma bicatenaria, que interactúan con su secuencia complementaria (Cuevas *et al.*, 2016).

Si existe complementariedad en el extremo 3' se induce a que ambos iniciadores se traslapen en dicho extremo y sirvan de templados y a su vez de iniciadores para que la polimerasa los extienda generando así pequeños amplicones referidos como dímeros de primers, es decir, de productos inespecíficos, reduciendo la cantidad de oligonucleótidos disponibles en la reacción, provocando un menor rendimiento del amplicón de interés (Bolívar, Rojas & Lugo, 2013). Los dímeros de primers se generan cuando hay complementariedad de bases en el

extremo 3', ya que ambos cebadores se traslapan y sirven de molde en la misma reacción de PCR (Martínez, 2018).

### GEN 18S

El gen ribosomal 18S es un componente de la subunidad pequeña de los ribosomas de organismos eucariontes, es la región del genoma de los *Glomeromycota* (hongos formadores de micorrizas arbusculares) más secuenciada para estudios de filogenia y para la caracterización de especies. El gen que codifica para el 18S rRNA permite la exploración de la diversidad de organismos eucariontes, tales como hongos, levaduras y algas, presentes en una muestra sin importar su origen, la que puede ser ambiental o provenir desde otro organismo (interacción huésped/patógeno) (Gómez, Martínez & Carreón, 2012).

### SECUENCIACIÓN SANGER (MÉTODO SANGER O DE TERMINACIÓN DE LA CADENA)

La secuenciación de ADN permite determinar el orden de los nucleótidos (A, G, C, T) de una molécula de ADN, esto es importante, ya que este orden es el que determina la información genética para el funcionamiento de los organismos. El principio de este método de síntesis enzimática es la incorporación selectiva de dideoxinucleótidos trifosfato (ddNTPs), estos nucleótidos carecen del OH en el extremo 3', por lo que si se incorporan durante la síntesis se impide la incorporación de un nuevo nucleótido y se termina la elongación de la cadena, de esta forma se generan fragmentos de distintos tamaños que terminan en todos los nucleótidos de la molécula de ADN, los cuales son separados por electroforesis para determinar la secuencia a partir del ddNTP incorporado y el tamaño de los fragmentos. Este método es útil para la secuenciación de genes o fragmentos individuales de ADN y en proyectos de secuenciación a baja escala que involucran un número reducido de fragmentos. (Ongay-Larios & Códiz, 2021).

### PLAGAS DE INTERÉS ESTUDIADAS EN ESTE SERVICIO SOCIAL. HONGOS

- *Phytophthora capsici* Leonian (Tizón o marchitez del pimiento).

Se considera uno de los patógenos de mayor interés científico debido a su rápida dispersión, adaptación hacia nuevos hospedantes y ambientes, lo

cual podría representar una amenaza para la seguridad alimentaria a nivel mundial. Es el principal fitopatógeno del cultivo de chile (*Capsicum annuum*) y de diversas plantas de interés comercial en México. (Reyes et al., 2021).

- *Fusarium oxysporum* (Podrición radical).

Cuenta con el mayor número de hospedantes, los síntomas iniciales de plantas afectadas muestran en las hojas coloraciones amarillentas, que se van tornando necróticas, especialmente en la punta, hasta alcanzar toda la hoja para, por último, marchitarse (González et al., 2020).

## INSECTOS

- *Grapholita molesta* (Palomilla oriental de la fruta).

Con base en la Norma Internacional para Medidas Fitosanitarias (NIMF) No. 8 “Determinación de la situación de una plaga en un área”, *Grapholita molesta* es una plaga cuarentenaria presente solo en el estado de Baja California y sujeta a control oficial, es considerada una de las plagas más destructivas y de importancia económica en frutales de hueso a nivel mundial. Dentro de sus principales hospedantes se encuentran especies de la familia Rosaceae como durazno, nectarina, albaricoque, ciruela, pera y manzana. *G. molesta* perfora los brotes y frutos, causa marchitez en hojas y provoca la muerte progresiva de tallos y brotes (SENASICA, 2017).

## MALEZAS

- *Commelina benghalensis* Leonian (Hierba de pollo).

Esta especie es considerada una de las malezas más agresivas en diversas partes del mundo. Su control agronómico es dificultoso y causa pérdidas económicas importantes en diversos cultivos de al menos tres continentes. Es nativa de África y Asia tropical, aunque ha sido introducida en casi todo el mundo (Vallecillo, 2018).

## NEMATODOS

- *Meloidogyne chitwoodi* (nemátodo agallador de la papa)

Es una especie criófila, lo que significa que puede sobrevivir con temperaturas del suelo por debajo de 0° C y los huevos eclosionan a

temperaturas <10°C. La duración de su ciclo de vida está altamente influenciada por la temperatura. Provocan lesiones necróticas, es la causa del enanismo, tendencia a la sequía o muerte de la planta afectada. Además, la presencia del nemátodo provoca la formación de agallas en la raíz. Dentro de sus principales hospedantes se encuentran la alfalfa, papa, tomate y zanahoria (SAG, 2004).

## JUSTIFICACIÓN

Actualmente se ha reportado un número significativo de técnicas moleculares para la detección e identificación de microorganismos y otros organismos patógenos en plantas, siendo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la técnica más utilizada, mientras que la secuenciación de primera generación se perfila como una técnica de gran aplicabilidad. Los métodos moleculares no constituyen protocolos estandarizados útiles para la amplificación de cualquier gen, lo que dificulta su utilización en algunos casos. Por esta razón se debe trabajar arduamente para superar tales limitaciones (Palomino & González, 2014).

Actualmente, para diversos cultivos de interés económico, en la Senasica se tiene bajo vigilancia 5 plagas identificadas como de alto riesgo, entre las que se encuentran especies de hongos como *Phytophthora capsici* y *Fusarium oxysporum*, insectos *Grapholita molesta*, malezas *Commelina benghalensis* y nemátodos *Meloidogyne Chitwoodi*.

De las especies de plagas mencionadas, la correcta identificación de éstas juega un papel preponderante para la toma de decisiones en cuanto a su manejo de estos. Por tanto, es importante hacer uso de los avances en la biología molecular en relación con métodos de identificación y caracterización de plagas y enfermedades basados en el uso de marcadores moleculares como son el gen 18S, el cual fue utilizado como marcador molecular en el curso de este servicio social.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Estandarizar la reacción de PCR punto final utilizando dos juegos de oligonucleótidos específicos para el gen 18S ribosomal, con la finalidad de identificar a las especies proporcionadas por los diferentes laboratorios del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF).

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la calidad y concentración de muestras de DNA para análisis vía PCR.
- Estandarizar las condiciones óptimas para la amplificación de dos fragmentos del gen 18S de las especies *Phytophthora capsici* y *Fusarium oxysporum*, insectos *Grapholita molesta*, malezas *Commelina benghalensis* y nemátodos *Meloidogyne chitwoodi*.
- Confirmar vía secuenciación Sanger la identidad de los amplicones obtenidos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### LOCALIZACIÓN

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Biología Molecular del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF) de la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agropecuaria (SENASICA).

### MATERIAL GENÉTICO

Se utilizaron 5 muestras de ADN (Imagen 1) purificadas de las siguientes especies: *Phytophthora capsici* Leonian, *Fusarium oxysporum*, *Grapholita molesta*, *Commelina benghalensis* y *Meloidogyne Chitwoodi*, proporcionadas por los laboratorios del CNRF.

Con el fin de verificar la calidad en absorción A260/280 y concentración de cada muestra de ADN, se cuantificaron mediante un espectrofotómetro Nanodrop 2000c. (Imagen 2).



Imagen 1. Cinco muestras de ADN y 1 tubo de H<sub>2</sub>O.



Imagen 2. Verificación de calidad en absorción 260/280 y concentración en  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de muestras de ADN.

## OLIGONUCLEÓTIDOS

Se diseñaron los primers UF1-UR1 y UF2-UR2, ambos localizados en el gen nuclear 18S.

**Tabla 2. Información sobre los 2 juegos de primers utilizados**

Primer	Secuencia 5'-3'	Tamaño	Tm (C°)	Amplicón
UF1	CCAGCAGCCGCGGTAATTCC	20nt	67.5	441
UR1	GAGTCAAATTAAGCCGCAGGC TCCAC	26nt	68.8	
UF2	GACGGAAGGGCACCAC	16nt	61.8	148
UR2	CTAAGAACGGCCATGCAC	18nt	61.3	

En esta tabla se presenta el nombre de los primers, sus secuencias en dirección 5'-3', tamaño de los oligonucleótidos, Tm y amplicón esperado.

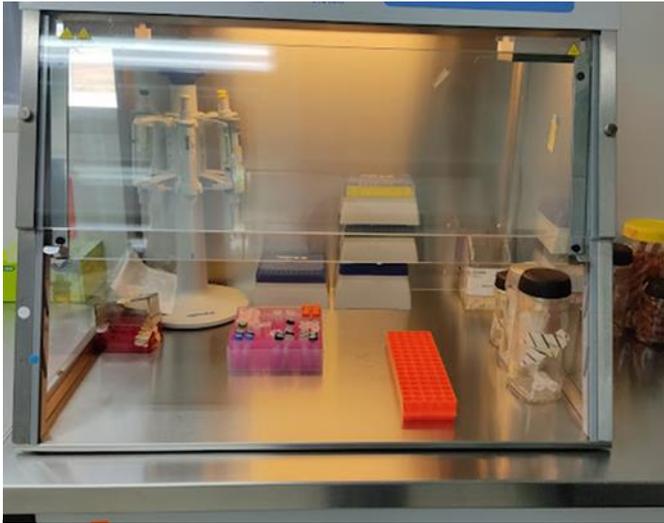
## REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25µL, para cada muestra de DNA se hizo una máster mix (Imágenes 3 y 4) la cual se dividió en 7 repeticiones, dando un total de 35 repeticiones de las 5 muestras de DNA. Cabe resaltar que la máster mix fue la misma tanto para los primers UF1 - UR2 y los primers UF2 - UR2.

Las mezclas de reacción para la PCR incluyeron los siguientes componentes:

**Tabla 3.** Mezclas de reacción para PCR.

REACTIVO	[INICIAL]	VOLUMEN 1XµL	[FINAL 7X]
H <sub>2</sub> O	---	16.25	113.75
Buffer	10X	2.5	17.5
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1.25	8.75
dNTP	10 mM	0.5	3.5
F	10 µM	1	7
R	10 µM	1	7
Taq Pol	5 U/µl	0.5	3.5
DNA	30-100 ng/µL	2	14
Volumen final	-	25	175



Imágenes 3 y 4. Preparación de máster mix.

## PCR

Se llevó a cabo una estandarización de los dos juegos de primers mediante la utilización de gradientes de temperatura (Imágenes 5 y 7). Se empleó un termociclador BIO-RAD T1000TM Thermal Cycler (Imagen 6).

Las condiciones de ciclaje (Imagen 8) fueron las siguientes:

TEMPERATURA (T°)	FASE PCR	TIEMPO	CICLOS
94°C	Desnaturalización	3 minutos	1
94°C	Alineamiento	1 minuto	30
Gradientes de temperatura 54°C – 64°C	54°C, 56°C, 58°C, 60°C, 62°C y 64°C	30 segundos	
72°C	Extensión	30 segundos	
72°C		5 minutos	1
4°C	Conservación	5 minutos	

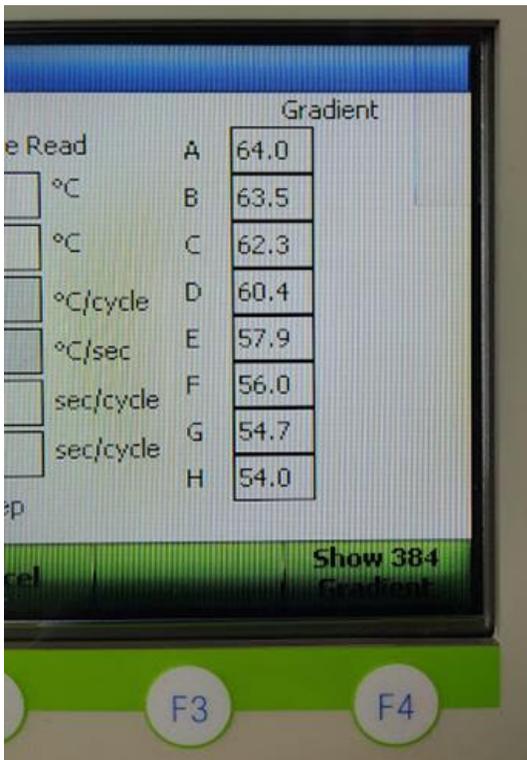


Imagen 5. Configuración de los gradientes de temperatura para PCR.



Imagen 6. Termociclador BIO-RAD T1000TM Thermal Cycler



Imagen 7. Configuración en el termociclador de los gradientes de temperatura.

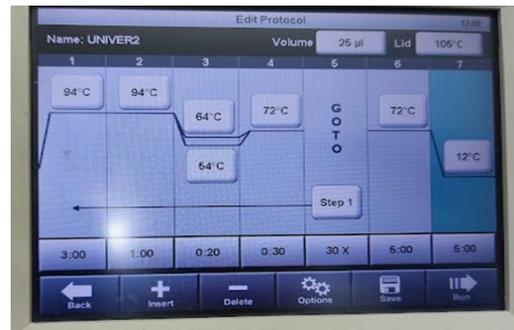


Imagen 8. Configuración del ciclaje en el termociclador para PCR.

### PRIMERS UFI – URI

La colocación de las muestras dentro de los pozos del termociclador (Imagen 9) fueron las siguientes indicando la temperatura en la cual se colocaron cada uno de los tubos de muestra, para esta corrida de PCR el termociclador se tardó 3:36:00 horas (Imagen 10).

ESPECIE	CÓDIGO PARA PCR	TEMPERATURAS DEL TERMOCICLADOR					
		54°C	56°C	58°C	60°C	62°C	64°C
<i>Phytophthora capsici</i> Leonian	PC	1PC	2PC	3PC	4CP	5PC	6PC
<i>Fusarium Oxysporum</i>	FO	1FO	2FO	3FO	4FO	5FO	6FO
<i>Grapholita molesta</i>	GM	1GR	2GR	3GR	4GR	5GR	6GR
<i>Commelina benghalensis</i>	CB	1CB	2CB	3CB	4CB	5CB	6CB
<i>Meloidogyne Chitwoodi</i>	MC	1MC	2MC	3MC	4MC	5MC	6MC

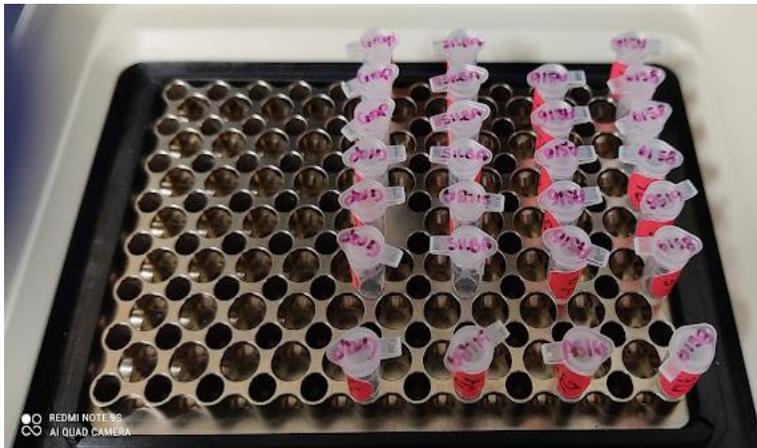


Imagen 9. Colocación de las muestras dentro de los pozos del termociclador



Imagen 10. Duración de la corrida de PCR el termociclador

### PRIMERS UF2 – UR2

La colocación de las muestras dentro de los pozos del termociclador fueron los siguientes, a cada uno se le otorgó un código indicando la temperatura en la cual se colocaron cada uno de los tubos de muestra.

ESPECIE	CÓDIGO PARA PCR	TEMPERATURAS DEL TERMOCICLADOR					
		54°C	56°C	58°C	60°C	62°C	64°C
<i>Phytophthora capsici</i> Leonian	PC	21PC	22PC	23PC	24CP	25PC	26PC
<i>Fusarium Oxysporum</i>	FO	21FO	22FO	23FO	24FO	25FO	26FO
<i>Grapholita molesta</i>	GM	21GR	22GR	3GR	24GR	25GR	26GR
<i>Commelina benghalensis</i>	CB	21CB	22CB	23CB	24CB	25CB	26CB
<i>Meloidogyne Chitwoodi</i>	MC	21MC	22MC	23MC	24MC	25MC	26MC

Se utilizó el equipo de primera generación QIAxcel el cual analiza fragmentos de ADN por medio de electroforesis capilar sensible de alta resolución.

## RESULTADOS

### MUESTRAS DE DNA

Con el fin de verificar la calidad en absorción A<sub>260/280</sub> y concentración en ng/μL de cada muestra de DNA, se analizaron mediante un espectrofotómetro NanoDrop 2000c dando los siguientes resultados:

**Tabla 1.** Resultados calidad y cantidad de la espectrofotometría

Nombre científico	ADN ng/μL	A <sub>260/280</sub>
<i>*Phytophthora capsici</i> Leonian	1173.8	1.99
<i>*Fusarium Oxysporum</i>	360.4	1.93
<i>*Grapholita molesta</i>	338.8	2.09
<i>*Commelina benghalensis</i>	92.5	1.59
<i>Meloidogyne Chitwoodi</i>	7.3	2.21

\*Para las especies que tuvieron un resultado en la concentración mayor a 50 ng/μL se realizó una dilución para que la concentración fuera de 20 ng/μL.

La dilución y los resultados calidad y absorbancia se muestran en la siguiente tabla.

**Tabla 2.** Resultados de calidad y absorbancia

ESPECIE	DILUCIÓN 20 ng/μL	RESULTADOS NANODROP	
		ADN ng/μL	A <sub>260/280</sub>
<i>*Phytophthora capsici</i> Leonian	1.28 μL MUESTRA + 48.72 μL H <sub>2</sub> O	25.2	1.85
<i>*Fusarium Oxysporum</i>	4.2 μL MUESTRA + 45.8 μL H <sub>2</sub> O	32.3	1.86
<i>*Grapholita molesta</i>	1.78 μL MUESTRA + 18.22 μL H <sub>2</sub> O	30.6	1.9
<i>*Commelina benghalensis</i>	6.5 μL MUESTRA + 13.5 μL H <sub>2</sub> O	32.5	1.61

## RESULTADOS DE PCR EN QIAXCEL

Una vez que se sacaron las muestras del termociclador, los tubos se colocaron en los pozos del QiAxel (Imagen 11) en el primer pozo superior de lado izquierdo se colocó un alineador universal, posteriormente se colocaron las muestras de la menor temperatura (54°C) a la mayor (64°C), se colocaron los 30 tubos pertenecientes a las 5 muestras de ADN.

Los resultados se clasificaron con el símbolo -, si tiene un solo guion (-) el amplicón no fue el esperado, si tiene dos (--) es un resultado intermedio, pero si se logró amplificar lo esperado se le otorgan 3 guiones (---) de las cuales solo una será la muestra que se envió a secuenciar.



Imagen11. Muestras de ADN en equipo QiAxel.

## PRIMERS UFI – URI

ESPECIE	TEMPERATURAS DEL TERMOCICLADOR					
	54°C	56°C	58°C	60°C	62°C	64°C
<i>Phytophthora capsici</i> Leonian	637(-)	643(--)	629(--)	627(---)	630(---)	631(---)
<i>Fusarium Oxysporum</i>	641(--)	638(---)	634(---)	626(---)	592(---)	625(---)
<i>Grapholita molesta</i>	641(---)	636(---)	633(---)	634(---)	634(---)	636(---)
<i>Commelina benghalensis</i>	773(--)	766(--)	764(--)	750(--)	779(--)	739(--)
<i>Meloidogyne Chitwoodi</i>	598(---)	601(---)	598(---)	595(---)	569(---)	589(---)

PRIMERS UF2 – UR2

ESPECIE	TEMPERATURAS DEL TERMOCICLADOR					
	54°C	56°C	58°C	60°C	62°C	64°C
<i>Phytophthora capsici</i> Leonian	145(--)	144(--)	143(--)	142(--)	142(--)	144(--)
<i>Fusarium Oxysporum</i>	144(--)	144(--)	144(--)	144(---)	145(---)	145(---)
<i>Grapholita molesta</i>	144(---)	144(---)	143(---)	144(---)	144(---)	145(---)
<i>Commelina benghalensis</i>	141(---)	140(----)	140(----)	140(----)	139(----)	139(--)
<i>Meloidogyne Chitwoodi</i>	145(--)	144(--)	142(--)	142(--)	144(--)	144(--)

Como se puede observar en ambas tablas, todas las muestras lograron amplificar, lo cual significa que tanto los primers como su estandarización fue satisfactoria.

De acuerdo con los resultados obtenidos que corresponden al juego de primers UF1-UR1 las muestras que se seleccionaron para enviar a secuenciar son las siguientes indicando cual es la temperatura de fusión (Tm) y su resultado en el QiAxcel.

ESPECIE	°C DEL TERMO.	RESULTADO (---)
<i>Phytophthora capsici</i> Leonian	60°C	142(--)
<i>Fusarium Oxysporum</i>	56°C	638(---)
<i>Grapholita molesta</i>	56°C	636(---)
<i>Commelina benghalensis</i>	56°C	766(---)
<i>Meloidogyne Chitwoodi</i>	56°C	601(---)

MUESTRA QUE SE LE REALIZÓ SECUENCIACIÓN SANGER  
Primers UF1 – UR1

ESPECIE	°C DEL TERMO.	RESULTADO (---)
<i>Meloidogyne Chitwoodi</i>	56°C	601(---)

Se seleccionó la muestra número 2 de la especie de *Meloidogyne chitwoodi*, la cual corresponde a la temperatura de 56°C en el termociclador dando un resultado en el QiAxcel de amplificación de 601 pb dando el resultado esperado por lo cual se envió a secuenciar.

Por cuestión de tiempo únicamente se secuenció una sola muestra. Se utilizó el método de Sanger en el laboratorio de Secuenciación y bioinformática del CNRF.

## RESULTADOS DE SECUENCIACIÓN

El resultado de la secuenciación fue analizada con el programa ChromasPro y para determinar su identidad a nivel de especie se utilizó el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

## IMAGEN DE LA SECUENCIA DENTRO DE NCBI

The screenshot displays the NCBI BLAST search results for query RID-ZWDTF299016. The interface includes a search bar, navigation links, and a table of results. The table lists sequences with their descriptions, scientific names, and various alignment metrics.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Meloidogyne aegracyperti isolate New Mexico small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Meloidogyne aeg...	254	254	99%	4e-63	98.60%	1711	MN037410.1
Meloidogyne graminicola isolate 20181030MGM small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Meloidogyne gra...	254	254	99%	4e-63	98.60%	785	MN447238.1
Meloidogyne oryzae genomic DNA containing NTS1-5S-NTS2-18S-ITS1-5.8S-ITS2-26S, complete ribosomal DN...	Meloidogyne ory...	254	254	99%	4e-63	98.60%	7734	LS974441.1
Meloidogyne oryzae genomic DNA containing NTS1-5S-NTS2-18S-ITS1-5.8S-ITS2-26S, complete ribosomal DN...	Meloidogyne ory...	254	254	99%	4e-63	98.60%	7733	LS974440.1
Meloidogyne oryzae genomic DNA containing NTS1-5S-NTS2-18S-ITS1-5.8S-ITS2-26S, complete ribosomal DN...	Meloidogyne ory...	254	254	99%	4e-63	98.60%	7401	LS974439.1
Meloidogyne graminicola genomic DNA containing Complete ribosomal unitt, Type II region	Meloidogyne gra...	254	254	99%	4e-63	98.60%	7515	LS974433.1
Meloidogyne graminicola genomic DNA containing Complete ribosomal unitt, Type I region	Meloidogyne gra...	254	254	99%	4e-63	98.60%	7735	LS974432.1
Meloidogyne graminicola strain MC-1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Meloidogyne gra...	254	254	99%	4e-63	98.60%	1693	MG273438.1
Meloidogyne graminicola isolate MEL1235 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Meloidogyne gra...	254	254	99%	4e-63	98.60%	1605	MK301102.1
Meloidogyne graminicola isolate MEL1090 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Meloidogyne gra...	254	254	99%	4e-63	98.60%	1639	MK301101.1
Meloidogyne graminicola isolate MEL1088 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Meloidogyne gra...	254	254	99%	4e-63	98.60%	1611	MK301100.1
Meloidogyne minor isolate NNCNZ3210-3237 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Meloidogyne minor	254	254	99%	4e-63	98.60%	1531	KX071111.1
Meloidogyne chitwoodi voucher 1S-7996 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Meloidogyne chit...	254	254	99%	4e-63	98.60%	2274	KP901059.1
Meloidogyne naasi voucher 14-13539 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Meloidogyne naasi	254	254	99%	4e-63	98.60%	2013	KP901048.1

## COMPARACIÓN DE RESULTADOS EN NCBI

blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr\_2437461973

National Library of Medicine  
National Center for Biotechnology Information

BLAST® » blastn suite » results for RID-ZZDHBX7C013

Log in

Home Recent Results Saved Strategies Help

< Edit Search Save Search Search Summary ▾

How to read this report? BLAST Help Videos Back to Traditional Results Page

Job Title **gb|EU669935.1|**

RID [ZZDHBX7C013](#) Search expires on 03-03 03:31 am [Download All](#) ▾

Program BLASTN [Citation](#) ▾

Database nt [See details](#) ▾

Query ID [EU669935.1](#)

Description Meloidogyne fallax strain MeloFal11 small subunit ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, and 28S large subunit ribosomal RNA gene, complete sequence

Molecule type nucleic acid

Query Length 1689

Other reports [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#) ?

**Filter Results**

Organism only top 20 will appear  exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

[+ Add organism](#)

Percent Identity  to  E value  to  Query Coverage  to

[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions Graphic Summary **Alignments** Taxonomy

Alignment view   CDS feature [Restore defaults](#) [Download](#) ▾

## DETERMINACIÓN DE IDENTIDAD A NIVEL ESPECIE MEDIANTE BLAST

blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr\_2437461973

[Download](#) ▾ [GenBank](#) [Graphics](#) [Next](#) ▲ [Previous](#) ◀ [Descriptions](#)

**Meloidogyne chitwoodi isolate E7149-1 18S small subunit ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, and 28S large subunit ribosomal RNA gene, complete sequence**

Sequence ID: [ON496983.1](#) Length: 7662 Number of Matches: 1

Range: 1: 1491 to 3182 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) ▲ [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
3105 bits(1681)	0.0	1689/1692(99%)	3/1692(0%)	Plus/Plus

```

Query 1   ATGTACCAGTTTAATCGATTTATCGAGAAACCGGAACGGCTCATTACAATGGCCATGAT 60
          |||
Sbjct 1491 ATGTACCAGTTTAATCGATTTATCGAGAAACCGGAACGGCTCATTACAATGGCCATGAT 1550
    
```

El resultado mediante secuenciación corrobora que el juego de oligonucleótidos UFI – UR1 diseñados específicamente para amplificar por medio de PCR fueron exitosos para detectar a la especie *M. chitwoodi*, ya que, en el BLAST, la secuencia más parecida correspondió a la misma especie. Este trabajo permitirá sentar las bases para continuar realizando análisis de secuenciación con las demás muestras para saber si los oligonucleótidos también amplifican la región esperada y si permiten delimitar cada especie de manera precisa.

## METAS

Dentro de las metas esperadas como alumna de la licenciatura en Agronomía fueron adentrarme al trabajo de laboratorio haciendo énfasis en extracciones de ADN, en mejorar la técnica de PCR que traemos por parte de la UAM, así como la manera de buscar información para poder crear un proyecto de investigación con una buena búsqueda de información, estas metas fueron cumplidas durante la realización de este servicio social.

## RECOMENDACIÓN PERSONAL

Una recomendación en lo personal sería poder enseñarle a los alumnos que el mundo de la agronomía no solamente se basa en trabajo de campo, sino que también existe el trabajo de laboratorio y que nuestra licenciatura nos abre las puertas al mundo de la ciencia, de igual manera el enseñarle a los alumnos a utilizar un programa para citar los documentos como por ejemplo el programa Mendeley el cual es muy utilizado por los investigadores en el CNRF lo cual facilita citar de una manera correcta sus investigaciones, reportes e incluso sus artículos de investigación que serán pronto a publicar.

## CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

ACTIVIDAD	JULIO				AGOSTO				SEPT.				OCT.				NOV.				DIC.				ENERO					FEB.				MA R	
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	5	1	2	3	4	1	
Visita a los laboratorios del CNRF	X																																		
Recaudación de extracciones de DNA en los distintos laboratorios del CNRF		X	X	X	X																														
Invitación: 1º Simposio Latinoamericano de PCR digital					X																														
Recepción de los juegos de oligonucleótidos para la identificación por PCR					X			X																											
Experimentación con muestras de DNA y juego de primers 1						X	X	X	X	X	X	X																							
Análisis de resultados de PCR con QiAxccl										X	X	X																							
Curso: Análisis transcripcional de genes mediante métodos de biología molecular														X																					
Invitación: Congreso de secuenciación para el diagnóstico de Fot R4T														X	X																				
Experimentación con muestras de DNA y juego de primers 2														X	X	X	X	X	X																
Análisis de resultados de PCR con QiAxccl																		X	X	X															
Escritura y revisión del reporte de servicio social				X			X			X				X				X	X	X	X	X	X			X	X	X	X	X	X	X	X	X	

## LITERATURA CITADA

- Azofeita-Delgado, A. (2006). *Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico*. [http://www.mag.go.cr/rev\\_meso/v17n02\\_221](http://www.mag.go.cr/rev_meso/v17n02_221)
- Bolívar, A., Rojas, A. & García, P. (2013) *PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización*. Volumen 3(1), Ene-Abr, 2014, p 25-33. [Instituto de Inmunología Clínica, Mérida-Venezuela].
- Calderón, K. (2018) *Microbiología molecular*. Posgrado en Biociencias, Universidad de Sonora. [http://www.posgradoenbiociencias.uson.mx/wp-content/uploads/2018/12/UNIDAD-5\\_KC\\_CAP-1.pdf](http://www.posgradoenbiociencias.uson.mx/wp-content/uploads/2018/12/UNIDAD-5_KC_CAP-1.pdf)
- Claros, G., Saladrigas, V. & González, D. (2004) *Vocabulario inglés español de bioquímica y biología molecular*. REB 23 (1): 42-54. [http://www.facmed.unam.mx/publicaciones/ampb/numeros/2004/03/2004\\_117\\_42-54\\_VOCABULARIO.pdf](http://www.facmed.unam.mx/publicaciones/ampb/numeros/2004/03/2004_117_42-54_VOCABULARIO.pdf)
- Cuevas, E., Morales, M., Treviño, L., Aparicio, R. & Hernández, J. (2016) *Evaluación de oligonucleótidos para medir expresión genética durante la marchitez bacteriana del tomate* [Laboratorio de Investigación en Biotecnología, Universidad Politécnica del Estado de Morelos]. [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-73802016000200141](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802016000200141)
- Escobar, M. (2014) *Análisis de la variabilidad genética de la isla de patogenicidad (LIP1) en cepas de Listeria monocytogenes aisladas desde alimentos y de casos clínicos*. [Laboratorio de Microbiología, Universidad de Valparaíso, Chile]. <http://repositoriobibliotecas.uv.cl/handle/uvsc1/7672>
- Gómez, N., Martínez, M. & Carreón, Y. (2012) *Utilización del ADN ribosomal 18S para la identificación de Hongos Micorrízicos Arbusculares que colonizan plantas de aguacate (Persea americana Mill.)* Laboratorio de Genética y Microbiología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán. <https://www.biologicas.umich.mx/index.php?journal=biologicas&page=article&op=view&path%5B%5D=136&path%5B%5D=135>
- González, C., Lagos, L., Rodríguez, V., Mora, S. & Betancourth, C. (2020) *Caracterización de Fusarium spp. asociado con la pudrición basal de la cebolla de rama*. [Sanidad Vegetal, Universidad de Nariño, Colombia]. <http://www.scielo.org.co/pdf/rudca/v23n1/2619-2551-rudca-23-01-e1471.pdf>

- Martínez, I. (2018) *Análisis in silico e in vitro de un conjunto de primers para su aplicación en PCR múltiple real time*. [Sección de biología molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay]. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/21380/1/uy24-19138.pdf>
- Ongay-Larios, L. & Códiz, G. (2021). *Secuenciación de ADN por el método de terminación de la cadena de Sanger*. 45(2021) 23-34. <http://bq.facmed.unam.mx/tab/wp-content/uploads/2021/06/6-Ongay-Larios-secuenciacion.pdf>
- Ongay-Larios, L. & Mora, D. (2021). *Síntesis química de oligonucleótidos: Método de fosforamiditas*. [Unidad de Biología Molecular, Instituto de Fisiología Celular Universidad Nacional Autónoma de México] 45(2021), 1-10. <http://bq.facmed.unam.mx/tab/wp-content/uploads/2021/06/4-Ongay-Larios-oligos.pdf>
- Palomino, C. & González, Y. (2014) *Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones*. [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1726-46342014000300020](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342014000300020)
- Reyes, A., Rodríguez, G., Fernández, S., Pedraza, M. Larsen, J. & Vázquez, G. (2021) *Caracterización morfológica de aislados de *Phytophthora capsici* provenientes de Jalisco y Michoacán, México*. [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-33092021000100105](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092021000100105)
- Serrato, A, Flores, Ll., Aportela, J. & Sierra, E. (2014). *PCR: reacción en cadena de la polimerasa*. [https://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con4\\_uibd.nsf/770DBBBD5ADF759505257D4900580FE6/\\$FILE/HerramientasMolecularesAplicadasEcolog%C3%ADa](https://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con4_uibd.nsf/770DBBBD5ADF759505257D4900580FE6/$FILE/HerramientasMolecularesAplicadasEcolog%C3%ADa)
- Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). (2004) *Meloidogyne chitwoodi (Golden et al.) Informativo sanitario*. [Gobierno de Chile]. <https://www2.sag.gob.cl/agricola/vigilancia/Meloidogyne.pdf>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) (2016) *El impacto de las plagas y enfermedades en el sector agrícola*. <https://www.gob.mx/siap/articulos/el-impacto-de-las-plagas-y-enfermedades-en-el-sector-agricola>
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). (2017). *Palomilla oriental de la fruta *Grapholita molesta**

Busck.

<https://prod.senasica.gob.mx/SIRVEF/ContenidoPublico/Fichas%20tecnicas/Ficha%20T%C3%A9cnica%20de%20palomilla%20oriental%20de%20la%20fruta.pdf>

Tamay De Dios, L., Ibarra, C. & Velasquillo, C. (2013) *Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real*. [Laboratorio de Biotecnología, Centro Nacional de Investigación y Atención a Quemados. Instituto Nacional de Rehabilitación (INR), Ciudad de México, México].

<https://www.medigraphic.com/pdfs/invdis/ir-2013/ir132d.pdf>

Vallecillo, P. (2018) *Valoración de riesgo de introducción de la especie *Commelina benghalensis* L., a Nicaragua*. [Facultad De Agronomía.

## ANEXO DE EVIDENCIAS

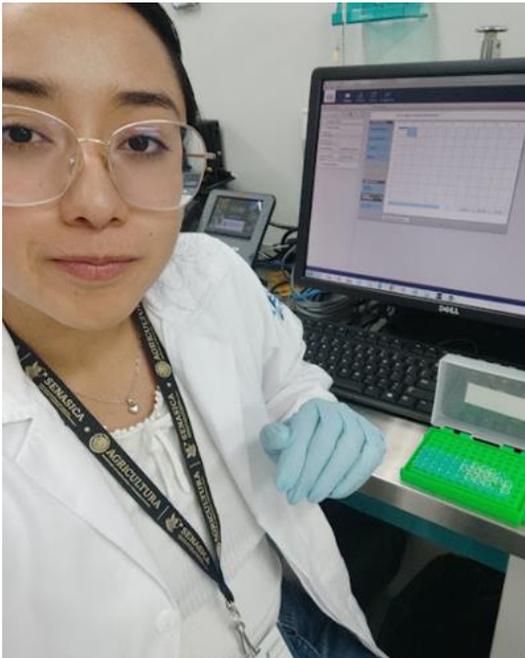


Foto 1. Análisis de muestras en QiAxel.

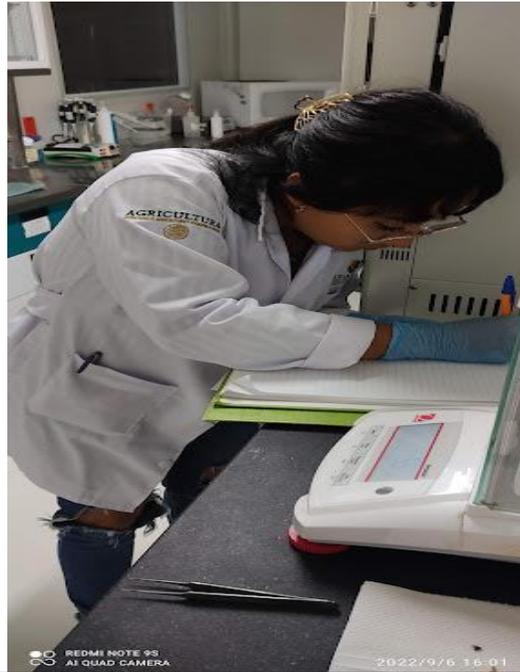


Foto 2. Uso de balanza analítica para pesar insectos.



Foto 3. Muestras de barrenador de las ramas del aguacate (*Copturus aguacatae*) en estado larvario y adulto.



Foto 4. Muestras de barrenador de las ramas del aguacate (*Copturus aguacatae*) en estado larvario.



Foto 5. Centrifuga para meter muestras a un cierto número de rpm.



Foto 6. Experimentación con primers 1 (reverse y forward).



Foto 7. Experimentación con primers 1 (reverse y forward).



Foto 8. Centrifuga, su principal función es bajar cualquier gota de muestra que haya quedado en la pared del tubo, de igual manera sirve para quitar las pequeñas burbujas que tiene la muestra.



Foto 9. Primer día del curso “Tecnologías de secuenciación para el diagnóstico de Foc R4T, en el simposio el Dr. Víctor Torres dando la bienvenida a 8 países que fueron de visita al Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria.



Foto 10. Presentación de los diferentes laboratorios del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, tanto los jefes de laboratorio como los técnicos.