

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
DE GUATEMALA**

Facultad de Ciencias y Humanidades



Excelencia que trasciende

**IDENTIFICACIÓN DE LA PRESENCIA DE BACTERIAS
PATOGENICAS DEL GÉNERO PSEUDOMONAS EN CULTIVOS
DE CHAMPIÑÓN, *Agaricus bisporus*, EN GUATEMALA
UTILIZANDO LA TÉCNICA DE REACCIÓN MÚLTIPLE
EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR MÚLTIPLE).**

PEDRO PABLO GARCÍA SEGURA

Guatemala
2010



**IDENTIFICACIÓN DE LA PRESENCIA DE BACTERIAS
PATOGÉNICAS DEL GÉNERO PSEUDOMONAS EN CULTIVOS
DE CHAMPIÑÓN, *Agaricus bisporus*, EN GUATEMALA
UTILIZANDO LA TÉCNICA DE REACCIÓN MÚLTIPLE
EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR MÚLTIPLE).**

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
DE GUATEMALA**

Facultad de Ciencias y Humanidades

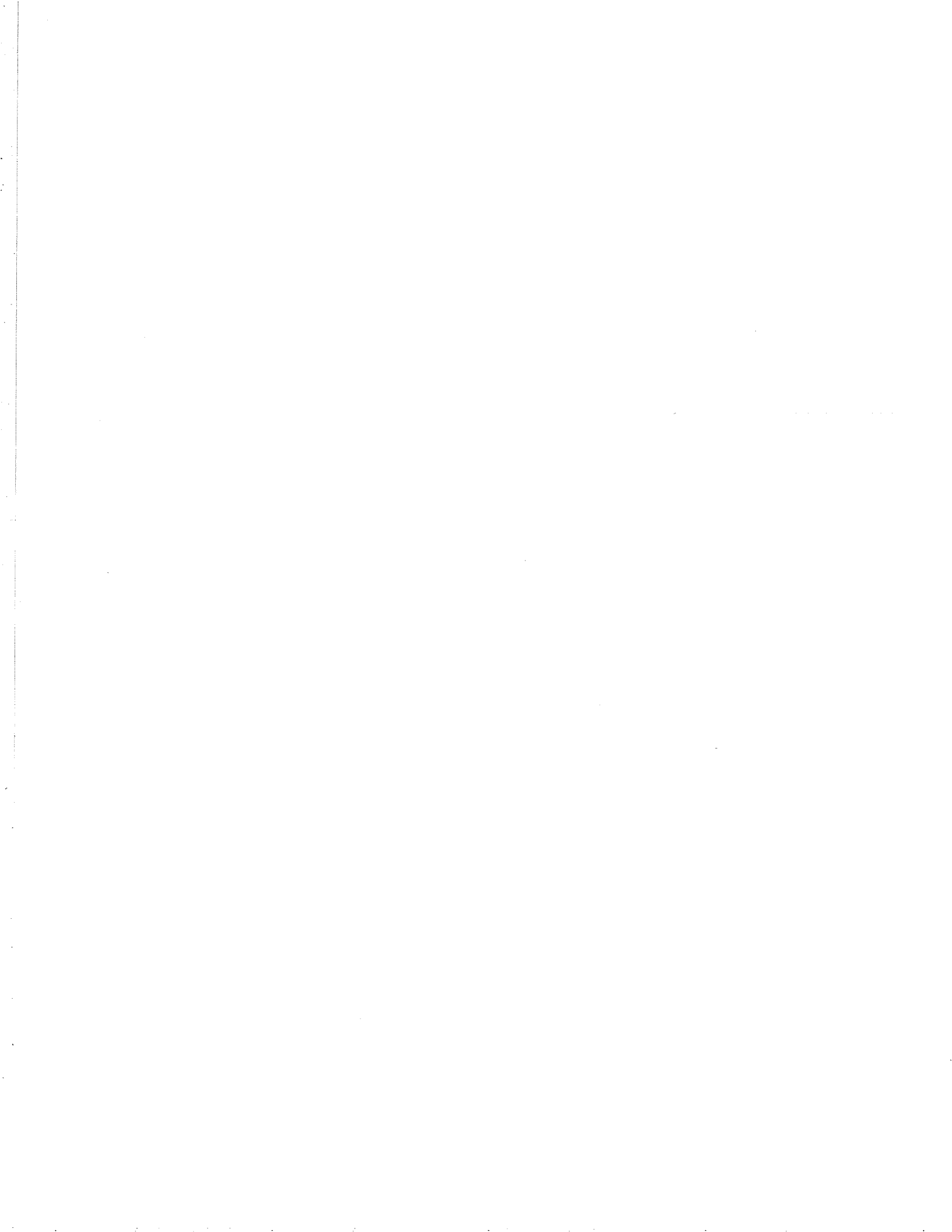


Excelencia que trasciende

**IDENTIFICACIÓN DE LA PRESENCIA DE BACTERIAS
PATOGENICAS DEL GÉNERO PSEUDOMONAS EN CULTIVOS
DE CHAMPIÑÓN, *Agaricus bisporus*, EN GUATEMALA
UTILIZANDO LA TÉCNICA DE REACCIÓN MÚLTIPLE
EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR MÚLTIPLE).**

Trabajo de investigación presentado por
Pedro Pablo García Segura
para optar al grado académico de
Licenciado en Bioquímica y Microbiología

Guatemala
2010



AGRADECIMIENTOS

Primero que nada, quiero agradecer a mi familia por el apoyo incondicional ya que sin el esfuerzo realizado por ellos, ni siquiera habría sido posible llevar a cabo mis estudios universitarios. A mi padre Miguel, mi madre Flor, mis hermanas Nicté y Paola, a mi novia Daniela y a María Ortiz, les agradezco porque su apoyo, ánimo y alegría son la energía que me permite seguir adelante.

Este estudio surgió inicialmente como una búsqueda de un tema de tesis en la carrera de Bioquímica y Microbiología. Luego de preguntar en distintos sitios, fue la Licenciada Margarita Palmieri quien me abrió sus puertas y planteó la idea inicial de trabajar con champiñones y las principales enfermedades que los afectan. Estoy completamente agradecido por brindarme la oportunidad para formular y llevar a cabo este proyecto y formar parte del laboratorio de Protección Vegetal.

Luego de una extensa revisión bibliográfica acerca de estos hongos, se identificó que existe falta de información y documentación sobre un problema real para los productores de champiñón en Guatemala: el manchado marrón del hongo causado por bacterias. Al presentar esta idea, inmediatamente fui apoyado por la Licenciada Palmieri para escribir y presentar una propuesta de proyecto para solicitar fondos a SENACYT (Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación) en la rama FODECYT (Fondos para el Desarrollo Científico y Tecnológico).

Esta propuesta fue escrita, organizada y revisada durante el curso de Técnicas de Investigación, impartido por la Licenciada Maricruz Álvarez, a quien agradezco por su colaboración y tiempo dedicado. Debo decir que esto fue de gran ayuda para desarrollar una propuesta (y protocolo de tesis) de calidad y que, luego de unos meses fue aprobada como el proyecto FODECYT 037-2009.

Quiero agradecer a Juan Carlos Campollo, proveedor de las muestras de champiñón, ya que sin su ayuda no habría sido posible iniciar el proyecto. Sus muestras fueron la parte central y vital de este estudio.

Una vez iniciado el proyecto, no conocía del todo a lo que estaba a punto de entrar. Ser investigador principal no sólo significa llevar a cabo un proyecto en el laboratorio, sino manejar los procesos administrativos. Sin embargo, a lo largo de todo el proceso, tuve el apoyo incondicional de la Licenciada Dinora Roche Recinos, a quien agradezco por su ayuda y consejo.

Agradezco también a Ofelia Paniagua y Leyda Hernández, del área de Fitopatología del laboratorio de Protección Vegetal, por recibirme tan cálidamente dentro del laboratorio y ayudarme en el desarrollo de la parte experimental. Agradezco a Geidy Aguilar y María Eugenia Ayala por toda su ayuda en el proceso administrativo que era tan nuevo para mí.

Luego de un año, el proyecto ha llegado a su fin al igual que la carrera universitaria, a nivel de licenciatura. Quiero agradecer a la Doctora Pamela Pennington, Directora del departamento de Bioquímica y Microbiología, por su ayuda y colaboración tanto en la revisión de la tesis como en guiarme durante el proceso final de la carrera. También por toda su ayuda y tiempo dedicado a que los estudiantes de la carrera recibiéramos cada vez una mejor formación como profesionales.

En general, quiero agradecer a todas y cada una de las personas que estuvieron a mi lado durante la realización de este proyecto, involucradas directamente con el mismo o involucradas en mi vida personal. Les agradezco por haberme brindado su apoyo, colaboración, cariño y amistad.

ÍNDICE

	Página
AGRADECIMIENTOS.....	v
LISTA DE CUADROS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. METODOLOGÍA.....	19
III. RESULTADOS.....	33
IV. DISCUSIÓN.....	47
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	56
VI. LITERATURA CITADA.....	59
VII. ANEXOS.....	64

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Concentración final y volumen a utilizar de los reactivos para PCR.....	25
2. Secuencia de primers o cebadores	26
3. Programa para PCR-Múltiple.....	27
4. Cálculo de muestra: OpenEPI Sample Size Calculator.....	31
5. Número de hongos clasificados según la escala de severidad de los síntomas.....	33
6. Morfología de colonias aisladas en Agar Pseudomonas con suplemento CFC (OXOID) incluidas en bioensayo y PCR.....	34
7. Pruebas bioquímicas aplicadas a colonias aisladas de hongos infectados y controles sanos.....	35
8. Condiciones óptimas del PCR Múltiple para la identificación de bacterias del género <i>Pseudomonas</i> y la especie <i>Pseudomonas tolaasii</i>	36
9. Programa óptimo del termociclador para llevar a cabo el PCR Múltiple para la identificación de bacterias del género <i>Pseudomonas</i> y la especie <i>Pseudomonas tolaasii</i>	37
10. Tamaños de banda obtenidos en distintas colonias aisladas a partir de hongos con síntomas del manchado marrón, utilizando PCR Múltiple.....	39
11. Prueba de patogenia de colonias inoculadas en cubos de champiñón sin síntomas.....	43

12. Categorías de clasificación de las colonias utilizadas en PCR múltiple y bioensayo para realizar la prueba Fisher's Exact para determinar asociación entre bacterias del género *Pseudomonas* y la patogenicidad observada en el bioensayo..... 44
13. Cuadro de contingencia para la prueba Fisher's Exact para determinar la asociación entre colonias de trabajo del género *Pseudomonas* y la patogenicidad observada en el bioensayo..... 44
14. Número de hongos o "pools de hongos con presencia de colonias clasificadas como *Pseudomonas* spp. patogénicas, *Pseudomonas tolaasii*, o bacterias patogénicas no *Pseudomonas* spp..... 46

LISTA DE FIGURA

Figura	Página
1. Morfología del hongo (Basidiomycota).....	8
2. Champiñón con enfermedad del manchado marrón.....	10
3. Morfología de colonias rugosas y lisas de <i>Pseudomonas tolaasii</i> y <i>Pseudomonas gingeri</i>	13
4. PCR Múltiple bajo condiciones iniciales. Determinación del set de “primers” con un volumen de 2 µl de ADN.....	28
5. PCR Múltiple optimizado para la identificación de bacterias del género <i>Pseudomonas</i> y la especie <i>Pseudomonas tolaasii</i>	37
6. PCR Múltiple de colonias aisladas a partir de champiñones con síntomas del manchado marrón.....	40
7. Ejemplo de PCR Múltiple realizado con hongos comerciales con síntomas del manchado marrón.....	41
8. Hongos sin síntomas analizados por medio de PCR Múltiple.....	42

RESUMEN

El cultivo de hongos en Guatemala es un área en constante crecimiento desde 1970, produciéndose principalmente champiñón (68,504 kg/año en 2003), hongo ostra y hongo shiitake. En distintos países de Europa, Asia y América se han reportado pérdidas, económicamente significativas, de cultivos de champiñón debido a infección por bacterias del género *Pseudomonas*, principalmente *Pseudomonas tolaasii*. Se analizará la presencia de dichas bacterias en cultivos de hongos infectados, aunque no existe referencia que indique la presencia de estos patógenos en el champiñón guatemalteco, aún cuando se conoce que a causa de infecciones bacterianas no específicas, por lo menos una granja de cultivo ha estado fuera de servicio por casi un año en Guatemala. Por lo tanto, determinar la presencia de estas bacterias en el champiñón guatemalteco provee una herramienta para un control preventivo y correctivo en los cultivos, y consecuentemente ayuda al productor a evitar pérdidas económicas. Se analizaron muestras proporcionadas por una granja de champiñón localizada en el municipio de San José Pinula, departamento de Guatemala. Se optimizó la técnica de reacción múltiple en cadena de la polimerasa (PCR-Múltiple) para detectar estas bacterias y que esté disponible para los laboratorios, para que los productores puedan enviar sus muestras y saber si el patógeno se encuentra en sus plantaciones. Se espera beneficiar a la industria del cultivo del champiñón y otros hongos comestibles, ya que al dar a conocer la presencia de este tipo de bacterias, los productores pueden adoptar técnicas específicas para el control y prevención de su dispersión. Asimismo, esto permite que plantaciones futuras puedan adoptar técnicas preventivas desde su inicio e implementar monitoreos para identificar la presencia de este patógeno en sus campos y evitar pérdidas económicas a gran escala.

ABSTRACT

Mushroom production in Guatemala is an area in constant growth since the 1970's, mainly producing button mushroom (68,504 kg/year in 2003), shitake and oyster mushroom. Several European, Asian, and American countries, suffer from economical loss due to infection of the white button mushroom, also known as bacterial brown blotch, caused by bacteria of the genus *Pseudomonas* and specifically *Pseudomonas tolaasii*. This is why, in this study, a sample of infected button mushrooms will be analyzed in order to determine the presence of pathogenic bacteria belonging to this genus. Although there is a lot of information in other countries regarding this problem, there is no reference that indicates the presence of these bacteria as pathogens of the mushroom in Guatemala. Because of this, determining the presence of pathogenic *Pseudomonas* in Guatemalan button mushrooms will help provide a tool for a better control of these crops, before or after the infection has occurred, and will consequently help avoid economic loss. To achieve this, a sample of mushrooms provided by a mushroom farm located in the municipality of San José Pinula in Guatemala was analyzed, and bacteria were isolated. These were then analyzed through PCR Multiplex. The technique was optimized to detect bacteria from the genus *Pseudomonas* and specifically *Pseudomonas tolaasii*. This technique will be made available for the mushroom producers in order for them to have the opportunity to send samples of the crop to a laboratory and know if it is infected or not. Finally, this study is expected to benefit the mushroom industry in Guatemala, because, by providing the information that these pathogenic bacteria are present in the country, the producers can implement techniques and safety measures in order to control and avoid the infection, consequently avoiding economic loss.

I. INTRODUCCIÓN

Los hongos han sido parte de la dieta humana desde civilizaciones tan antiguas como la griega, egipcia, romana, y china. En países asiáticos como China, la industria de hongos comestibles realiza un fuerte aporte económico y proporciona fuentes de trabajo para una gran cantidad de personas. Solamente en China, se produce anualmente 200 toneladas de este tipo de hongos de lo que se obtiene una ganancia neta de 2 millones de yuanes. En América, también se ha dado un gran uso a los hongos por sus propiedades medicinales y su uso culinario. En 1975 se reportó el consumo de hongos en distintas comunidades de Guatemala (Lowy, 1975), demostrando que forman parte de la dieta guatemalteca. Sin embargo el cultivo de éstos, a nivel comercial, inició en 1970, produciendo principalmente el champiñón *Agaricus bisporus* (De León, 2003). Actualmente, en el mercado occidental, el champiñón es el hongo de mayor importancia comercial seguido por el hongo shitake (*Lentilula edodes*) y hongo ostra (*Pleotrus* sp.) (De León, 2003).

En países de Centro y Sur América, debido a la globalización cada vez se hace más importante ampliar el mercado agrícola hacia productos no tradicionales, dentro de los cuales se puede considerar a los hongos comestibles como *A. bisporus*. En el año 2003, se reportó una producción de 68,504 kg/año de champiñón, de lo cual 70% es consumido en el país y 30% es exportado (De León, 2003). Sin embargo, el costo de producción de este hongo en comparación al hongo ostra es más elevado debido al mantenimiento que requiere el cultivo. Entre los principales factores que elevan el costo se encuentra la infección por bacterias y otros hongos. En Nueva Zelanda, Japón, Australia, Venezuela, Argentina, Brasil y México, se han reportado pérdidas de cultivos debido a infecciones con bacterias del género *Pseudomonas*, principalmente por *Pseudomonas tolaasii* (Bessett, 1984). En otros estudios se ha identificado a especies de este género como patógeno del hongo ostra, *Pleotrus ostreatus*, sin embargo en este hongo la infección no es tan invasiva como en el champiñón. Bacterias de este género causan la enfermedad del manchado del champiñón, la cual produce manchas amarillentas o cafés, mal olor, consistencia ligosa y ocasionalmente ruptura del mismo. Esta enfermedad reduce la calidad del hongo (reduciendo las posibilidades de exportación) y según el grado de infección causa la pérdida de cultivos enteros. Sin embargo, en Guatemala no se ha reportado la presencia de esta bacteria (*Pseudomonas tolaasii*) o *Pseudomonas* spp. en cultivos de *A. bisporus*, por lo que es necesario identificar si éstas son las principales

causantes de infección en el champiñón guatemalteco, causando pérdidas de cultivos, con el fin de lograr un manejo adecuado. Este estudio también ayudaría a productores del hongo ostra en caso que éstos presentaran problema con dicha bacteria (como se ha reportado pero en menor grado). Además, es importante determinar la presencia de bacterias del género *Pseudomonas* en cultivos guatemaltecos y desarrollar una técnica que permita su identificación específica y exacta para ponerla a disposición de los productores de champiñón y así aportar a la industria una herramienta que les permitirá conocer al patógeno que afecta su cultivo e implementar un mejor manejo y control de los cultivos. La herramienta indirectamente ayudará a los productores a obtener un mayor beneficio tanto en el rendimiento de su cultivo, aumentando su ingreso económico y ofreciendo a la población consumidora un producto de mejor calidad e inocuo a la salud.

Históricamente, este es un país que basa su economía en productos agrícolas tradicionales. Sin embargo, actualmente, se hacen grandes aportes a la economía nacional por medio de la exportación de productos no tradicionales como son los champiñones y otros hongos comestibles. Los hongos comestibles y medicinales son algunos de estos productos, y su cultivo tiene gran potencial de desarrollo debido a su relativa facilidad. Para el grupo de productores y exportadores guatemaltecos de champiñón y hongo ostra (el cual también puede verse afectado por esta bacteria) el estudio es sumamente importante, ya que la pérdida de cultivos enteros de este hongo causan una pérdida financiera para los productores y consecuentemente para Guatemala. Hasta el año 2000, se reportó que el cultivo de hongos comestibles generó 76 empleos y se formaron diferentes programas no gubernamentales para incentivar la producción en el país (De León, 2003). Desde este año, este sector se ha desarrollado significativamente por lo que promover esto podría tener un beneficio para distintas comunidades rurales en cuanto a empleos otorgados por productores de hongos, así como el desarrollo estructural que esto implica.

El champiñón puede verse afectado por bacterias patógenas, así lo reportan estudios en distintos países de América Central y América del Sur, donde se han identificado bacterias del género *Pseudomonas*, como contaminantes del champiñón (Bessett, 1984). Sin embargo, no existe literatura que reporte la identificación de cualquier tipo de bacteria que afecte a este hongo, en Guatemala. Además, teniendo países tan cercanos como México, en los cuales se ha reportado este problema, es bastante probable que la infección ya ocurra también en Guatemala. Como fue comentado en comunicación oral con el señor J.C. Campollo (09/2008), en distintas

granjas de producción en Guatemala, han tenido problema de infección por bacterias en el champiñón, incluso dejando a una de estas productoras fuera de servicio por casi un año. Si estas granjas contaran con la información necesaria y los laboratorios con una técnica mucho más específica (en comparación a análisis bioquímicos) para la detección de bacterias patógenas se podría tener un mejor control de las mismas así como implementar medidas de prevención más efectivas y específicas. Obviamente esto tendría repercusiones en el área económica ya que el conocimiento y medidas de prevención disponibles facilitan el cultivo de hongos comestibles y evita, de forma indirecta, la pérdida de producto, aumentando así las ganancias.

Por tal razón, identificar estas bacterias es importante como herramienta para tomar medidas de prevención y control y así lograr que el productor evite la pérdida económica en la industria y el país. Para el grupo de productores y exportadores guatemaltecos de champiñón y hongo ostra (el cual también puede verse afectado por esta bacteria) el estudio es sumamente importante, ya que la pérdida de cultivos enteros de este hongo causan una pérdida financiera para los productores y consecuentemente para Guatemala. Entre más específica sea la identificación, mejores medidas de prevención y control podrán ser tomadas para poder tener una producción de calidad. Para identificar su presencia se analizaron champiñones que mostraban síntomas de infección (oxidación, mal olor, manchado del hongo, etc.), proporcionados por una granja localizada dentro del municipio San José Pinula, en el departamento de Guatemala. Se utilizaron también hongos sanos para determinar las diferencias entre las bacterias presentes en éstos y en los que presentaban síntomas.

Es importante también incentivar a los productores, facilitando las condiciones para que se promueva el cultivo y la explotación de este sector agrícola. Y lo que es más importante, ya que es un cultivo relativamente nuevo a nivel agrícola y comercial, es necesario que se estimule a que se produzca con calidad y teniendo en cuenta la identificación certera de los patógenos que afectan su producción para tomar medidas tanto preventivas como de control específicas al patógeno.

El estudio aporta información nueva a los productores del champiñón y otros hongos (como hongo ostra que también es afectado por las bacterias estudiadas pero en menor grado) en Guatemala, permitiéndoles así informarse más acerca de estas bacterias y cómo prevenir sus infecciones.

En el área social, se ha observado que la producción de hongos comestibles tiene un gran potencial debido a que existen las condiciones climáticas y los grupos sociales del área tanto rural como urbana que tienen la costumbre de consumir hongos silvestres, por sus usos comestibles como medicinales. Haciendo un mejor uso del área, se podría producir más, brindando empleos a las distintas comunidades en donde se cultive champiñón u otros hongos. Se conoce que existen distintas cooperativas para involucrar a la población en el cultivo de hongos comestibles en áreas urbanas como San Juan Sacatepéquez, Chimaltenango y Quetzaltenango (Morales, Bran y Cáceres, 2002). Este conocimiento estaría disponible para productores en estas áreas, facilitando las condiciones de su cultivo.

Los resultados de este estudio fueron transferidos a la Universidad del Valle de Guatemala para que estén disponibles a cualquiera que desee informarse más acerca del tema y desee implementar la técnica descrita. Además, se entregará una copia impresa del informe final a los productores de champiñón con los que se tenga contacto.

A. Antecedentes

1. Marco teórico. Los hongos han habitado la Tierra desde tiempos prehistóricos. El fósil más antiguo de un hongo pertenece al período Silúrico, hace 408 a 438 millones de años, en la era Paleozoica (Chang y Miles, 2004). Además, estos han sido parte de la vida humana, por ejemplo en civilizaciones tan antiguas como la griega, romana, egipcia, china y mexicana, se han recolectado hongos y han sido utilizados por sus propiedades medicinales, nutricionales y en algunos casos con fines religiosos. Los hongos habían sido recolectados desde tiempos antiguos, sin embargo, en el año 600 A.D. se empezó a cultivar hongos en China, pero fue hasta el año 1600 (en Francia) cuando se utilizó por primera vez composta como sustrato para cultivo de *Agaricus bisporus*, conocido como champiñón. Este avance permitió el cultivo a gran escala de hongos, convirtiendo al *A.bisporus* en el hongo comestible con mayor volumen de producción a nivel mundial, seguido por *Lentilula edodes* (shitake). En 1997, la producción de hongos en general superó 6 millones de toneladas métricas, lo cual equivale aproximadamente a \$28 millones (E.E.U.U.) (Chang y Miles, 2004).

Los hongos, o macrohongos (según la definición de Chang y Miles, 2004), son aquellos que tienen un cuerpo fructífero distintivo, son visibles a simple vista y pueden ser recolectados manualmente. Estos se clasifican en cuatro divisiones: los comestibles (ej. *Agaricus bisporus*), los medicinales, los venenosos y los de clasificación incierta. En su estructura estos hongos se componen de un órgano carnoso productor de esporas. Como organismos del reino Fungi, estos poseen una pared celular compuesta por el polisacárido quitina, lípidos y proteínas. Pueden reproducirse tanto sexual como asexualmente, no son fotosintéticos (debido a la falta de clorofila) por lo que son saprofiticos (obtienen alimento de materia orgánica inerte) o parasíticos (se alimentan de otro organismo causándole daño). Hasta el momento se han clasificado 140,000 especies distintas de hongos (macrohongos) de los cuales el 50% son considerados comestibles en cierto grado y 3,000 especies son comestibles (bajo cualquier condición). De éstas, solamente 100 especies son cultivadas para obtener algún beneficio económico, 60 con utilidad comercial y 10 producidas a nivel industrial e internacional (Chang y Miles, 2004).

A nivel ecológico, los hongos son de suma importancia en los procesos de reciclaje de nutrientes. Debido a que éstos no tienen la capacidad de producir su

propio alimento, deben obtenerlo del medio, y para esto los hongos saprofitos secretan enzimas que degradan la materia orgánica inerte disponible en el suelo. Esto contribuye en la reutilización de nutrientes, haciéndolos disponibles para organismos que pueden digerir hongos pero no materia orgánica directamente. Otros hongos forman una unión mutualista con plantas, asociándose a sus raíces, como la trufa negra que crece cerca de las raíces de árboles. El hongo colabora brindando nutrientes a la planta, ayudando a un mejor crecimiento, y ésta en cambio, le provee de carbohidratos. Esta característica es importante en procesos agroforestales para mejorar el crecimiento de árboles (Chang y Miles, 2004).

Además de interactuar con otros organismos de manera positiva o negativa (en el caso de hongos parasíticos), los hongos son constantemente atacados por otros organismos como bacterias, mohos, virus, e incluso otros hongos (no macrohongos). El champiñón es uno de los que puede volverse hospedero de una gran cantidad de estos microorganismos parasíticos. Dentro de las enfermedades más comunes de este hongo a nivel mundial se encuentra el síndrome de burbuja seca, burbuja húmeda, virosis, enfermedad del moho verde, y la más importante para este estudio: el manchado marrón causado por *Pseudomonas tolaasii* y otras *Pseudomonas*. Esta última enfermedad es la causa de la pérdida de muchos cultivos en todo el mundo. Existen reportes de Nueva Zelanda, Finlandia, Venezuela, Argentina, Brasil y México en los que se describe el daño que causa la bacteria a los cultivos del champiñón llevando a pérdidas económicas significativas. También se cuenta con evidencia de que esta bacteria puede estar presente y únicamente causar daño cuando llega a un alto nivel en los cultivos (Crown, 2006). Además se ha descrito que esta bacteria también infecta cultivos de *Pleotrus ostreatus*, sin embargo este hongo es levemente más resistente a la bacteria que el champiñón (Bessett, 1984).

a. *Agaricus bisporus*. Dentro de los hongos comestibles se encuentra el champiñón que es el principal hongo cultivado a nivel industrial, mundialmente. El champiñón se clasifica taxonómicamente como (Hawksworth, 2001):

Reino: Fungi

Filo: Basidiomycota

Clase: Homobasidiomycetes

Subclase: Homobasidiomycetidae

Orden: Agaricales

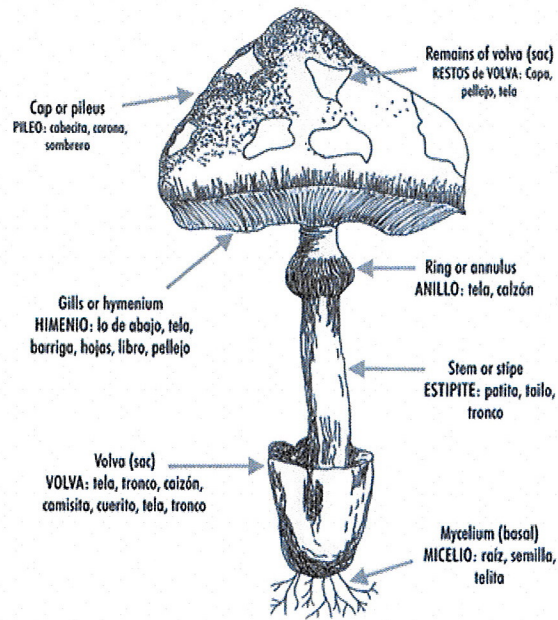
Familia: Agaricaceae

Género: *Agaricus*

Especie: *bisporus*

El filo *Basidiomycota* en general, se caracteriza por cuatro partes básicas generales: el sombrero (parte carnosa, redondeada en forma de sombrilla); himenio (situado en la parte inferior del sombrero, formado por laminillas que van desde el pie hasta el borde externo del sombrero; micelio (conjunto de hifas que constituyen la base del hongo) y pie o pedicelo (parte cilíndrica que soporta el sombrero y se une al micelio). En el caso de *A.bisporus* el sombrero mide entre 3 y 16 cm., es convexo, seco, liso o con pequeñas escamas y de color blanco. El himenio está separado del pie y es de color rosado y se torna café a medida que el hongo madura. El pie alcanza entre 2 y 8 cm de largo y 1 a 3 cm de ancho, es liso o con pequeñas escamas en forma de anillos que desaparecen al madurar y es de color blanco (Barbado, 2003). En su composición general, *A.bisporus* posee una gran cantidad de carbohidratos incluyendo polisacáridos (glicógeno), monosacáridos, disacáridos (trealosa), alcohol de azúcar (como manitol) y quitina. Además, la cantidad de agua equivale aproximadamente a un 90% del peso fresco. En cuanto a grasas, éste contiene ~0.31% de peso fresco lo cual lo hace bajo en grasa, 2.0% de proteína neta, una cantidad alta de potasio (0.36%), cobre (0.22%) y selenio (3.2 mg/kg en peso seco). Éste es una buena fuente de carbohidratos, proteínas y vitaminas (del complejo B). Sin embargo, posee todas las condiciones para sustentar el crecimiento de microorganismos ya que tiene un pH neutro y con una actividad de agua de 0.98, lo cual los hace altamente vulnerables (Gerald, 2006).

Figura 1: Morfología del hongo (Basidiomycota)



(Boa, 2004)

El *Agaricus bisporus* ha sido consumido desde las primeras civilizaciones, sin embargo fue hasta 1600 en Francia donde se realizó el primer cultivo utilizando compost. Actualmente este hongo se encuentra distribuido en todo el mundo, siendo los principales productores China y Estados Unidos. Sin embargo, el hongo es cultivado en países de Centro y Sur América y Europa. Para su cultivo, es necesario tener en cuenta que éste es un hongo de descomposición secundaria, lo que implica que otros organismos deben descomponer previamente la materia orgánica para que se puedan alimentar (Chang y Miles, 2004).

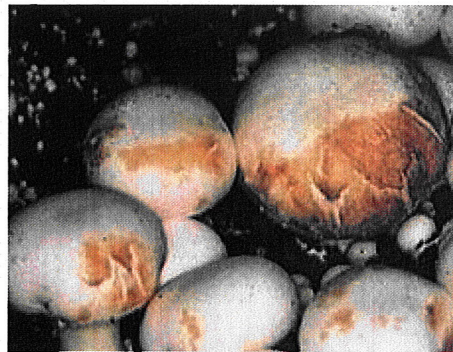
Un método para su cultivo es el uso de compost. Un buen compost debe tener suficiente nitrógeno orgánico, adecuada aireación, proporción adecuada de agua (humedad relativa), y material de cobertura (Barbado, 2003). Para la obtención de este sustrato, es necesario degradar materia orgánica utilizando bacterias u otros microorganismos no dañinos para el hongo que realicen fermentación de los distintos ingredientes que lo conforman. Para asegurar que los organismos son eliminados del compost, éste lleva un proceso de pasteurización. Por último la siembra del hongo se realiza utilizando micelio del *A. bisporus* esparcido en granos estériles de algún cereal (Volk, 2001). Esta semilla se mezcla en el compost. El cultivo se hace en instalaciones que disponen de cámaras con suficiente aislamiento térmico, sistema de ventilación, calefacción adecuada, control ambiental. El crecimiento del

champiñón requiere de un ambiente a 24°C, con humedad relativa entre 95 y 100%, una humedad del sustrato entre 50 y 75% y CO₂ en una concentración de 0.1%-0.5% (Chang y Miles, 2004). La colonización completa del compost tarda entre 12 y 20 días (Volk, 2001). Además del compost, puede utilizarse estiércol fresco de caballo como medio de cultivo para los champiñones. Sin embargo, por la competencia microbiana, es necesario prepararlo para evitar la invasión de otros organismos, esto se logra realizando un compost a base de estiércol. Este se obtiene de la mezcla de estiércol de equino (recolectado cada 24 horas de los establos) con paja de trigo, cebada y tallos blandos (Barbado, 2003). Los procesos de pasteurización y asepsia son importantes para evitar la contaminación de los champiñones ya que existen tanto bacterias como otros hongos y virus que pueden afectar el cultivo. Una de las principales enfermedades que afecta al *A.bisporus* es la del manchado marrón causado principalmente por *Pseudomonas tolaasii* y otras bacterias de este género.

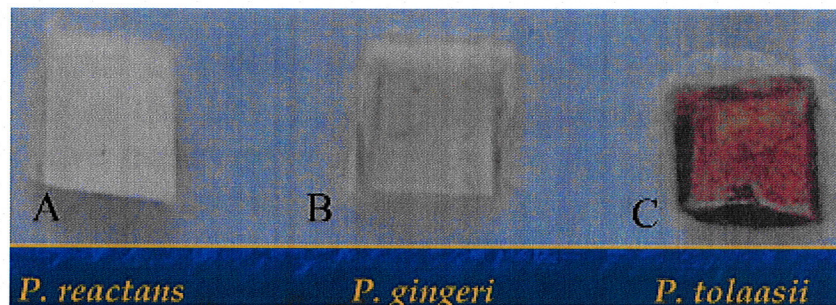
b. Enfermedad del Manchado Marrón en *A.bisporus*. Esta enfermedad del champiñón es causada por bacterias del género *Pseudomonas*, y es la causa más importante asociada a la pérdida de cultivos de hongos en el sector industrial. En muchos reportes se ha descrito a *Pseudomonas tolaasii* como la principal causante de la enfermedad, aunque también se ha comprobado que *Pseudomonas constantinii*, *P. gingeri*, y *P. reactans* pueden producir estos síntomas (Munsch, 2000).

La enfermedad fue descrita por primera vez en 1995 y tiene como síntomas la decoloración o manchado (en diferentes grados y tonos) del hongo aumentando el área infectada desde el punto de contacto inicial. El exceso de humedad y la presencia de agua sobre los cuerpos fructíferos promueven el desarrollo de la bacteria. Esta se localiza extracelularmente entre hifas, y se protege con una capa de materia descompuesta del hongo. La *Pseudomonas tolaasii* tiene la capacidad de producir una toxina extracelular, tolaasina, que causa el manchado del hongo (Chang y Miles, 2004).

Figura 2: Champiñón con enfermedad del manchado marrón.

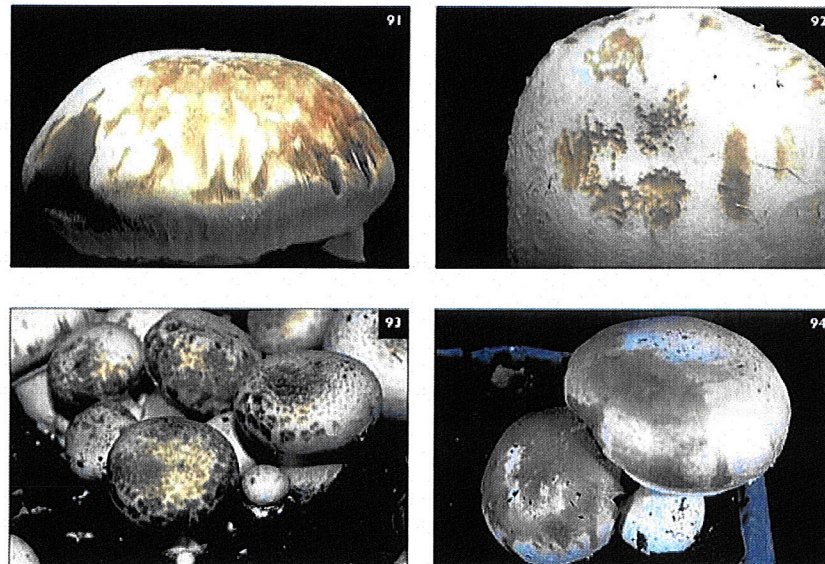


(Agrizak, 2008)



A. Muestra de champiñón sin síntoma. B. Manchado de nivel bajo según la clasificación de este estudio. C. manchado de nivel alto según la clasificación de este estudio.

(Brown, A., 2007)



Clasificación según escala de severidad: 91. Sombrero de champiñón con síntoma de nivel alto. 92. Sombrero de champiñón con síntomas de nivel medio-bajo. 93. Champiñones con síntomas de nivel alto. 94. Champiñones con síntomas de nivel medio-alto. Nota: la oxidación normal del hongo puede observarse como un síntoma de nivel bajo, sin embargo, este no progresa a un nivel mayor de descomposición y no produce hundimiento, viscosidad, ni mal olor.

(Gaze y Fletcher, 2008)

c. Género *Pseudomonas*. El género *Pseudomonas* está constituido por un grupo de microorganismos metabólicamente versátiles, que sobreviven en tierra y agua, y son patógenos para plantas, animales y humanos. Estos son bacilos levemente curvos, Gram negativos no esporulados, oxidasa positiva y aeróbicos estrictos. Tienen una temperatura óptima de crecimiento entre 15 y 30 °C y algunas especies pueden producir sideróforos fluorescentes de color amarillo, verde, azul y amarillo verdoso. Las bacterias de este género son móviles debido a que poseen uno o varios flagelos polares, algunas poseen cápsula de exopolisacáridos protegiéndose de fagocitosis y destrucción por células citotóxicas. En su estructura antigénica contienen los antígenos somáticos O y flagelares H, fimbrias y cápsula de polisacáridos. Además algunas producen la exotoxina A que bloquea la síntesis de proteínas y causa necrosis en tejidos (Purohit, 2003). Sin embargo, es importante mencionar que una bacteria de este género, *Pseudomonas putida*, es útil para el hongo ya que estimula la formación de cuerpos fructíferos (Nair y Fahy, 1972).

Debido a su gran versatilidad metabólica, éstas pueden habitar distintos nichos ecológicos. Son microbiota importante en la rizósfera y filósfera vegetal; han sido aisladas de ambientes acuáticos. El amplio potencial metabólico se debe en algunos casos a la presencia de plásmidos. Las *Pseudomonas* a menudo son utilizadas como organismo indicador en el estudio de desarrollo y dinámica de una comunidad microbiológica. Además, en estudios realizados respecto al cultivo de hongos, se ha identificado que 10% de las bacterias en el compost corresponden al género *Pseudomonas* (Purohit, 2003).

1) *Pseudomonas tolaasii*. La clasificación taxonómica de esta bacteria es la siguiente (Paine, 1919):

- **Reino:** *Bacteria*
- **Filo:** Proteobacteria
- **Clase:** Gamma Proteobacteria
- **Orden:** Pseudomonadales
- **Familia:** Pseudomonadaceae
- **Género:** *Pseudomonas*
- **Especie:** *tolaasii*

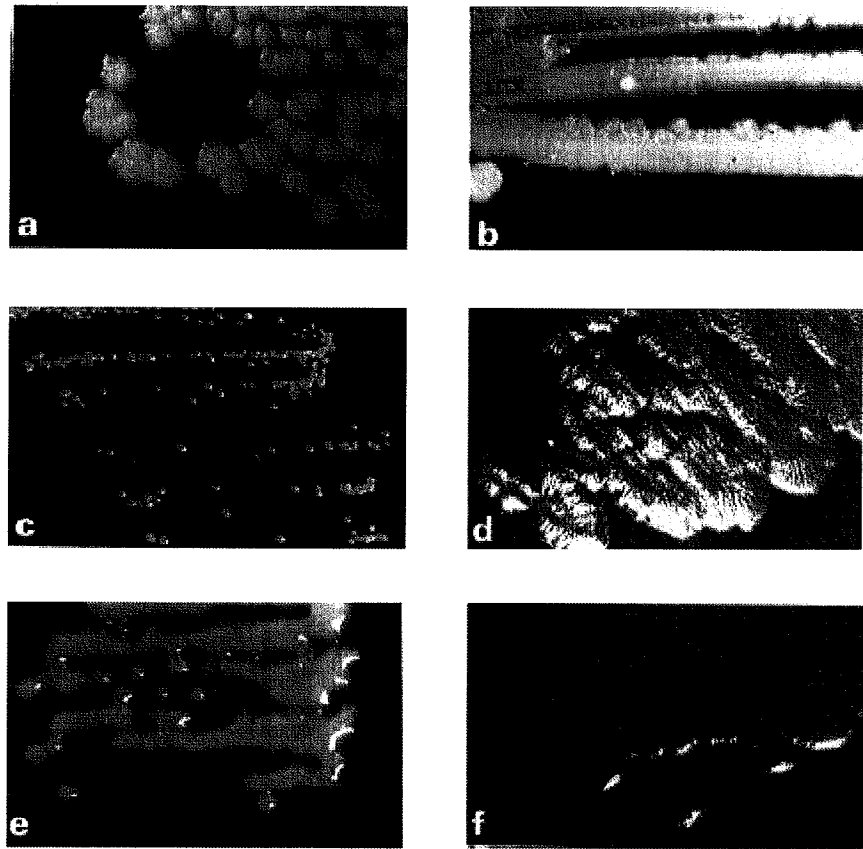
Es la principal causa del manchado marrón en cultivos de champiñón. La temperatura y humedad relativa favorecen el crecimiento de la bacteria en granjas de cultivos. Se reportó que una aplicación mínima de 2.7×10^6 UFC/ml de *P.tolaasii* es la cantidad mínima para inducir la enfermedad. Se ha determinado que esta bacteria produce una toxina extracelular de 1,985 Da y 18 aminoácidos, responsable del manchado de los hongos, denominada tolaasina. Esta proteína es un lipodepsipéptido que causa disrupción de las membranas celulares de distintos tipos de células. Tiene propiedades biosurfactantes y es formadora de poros en membrana. Para determinar la producción de tolaasina por la bacteria, existe el test de la línea blanca en agar (white line in agar assay). El principio se basa en la precipitación de la toxina en presencia de otro lipodepsipéptido (LDP) producido por *Pseudomonas reactans* (Godfrey *et al.* 2001). En otros estudios se ha diseñado primers específicos para *Pseudomonas* y *Pseudomonas tolaasii*. Los primers para el género tienen como blanco una región conservada del gen 16S ADNr (24f – 1492r), mientras que los primers para la *P. tolaasii* están dirigidos hacia una región que codifica para la proteína tolaasina (Pt-1A y Pt-1D1 / Pt-PM y Pt-QM). Estos primers fueron diseñados a partir de una secuencia de ADN de 2.3 kb de mutantes negativas para tolaasina contigua a un sitio de inserción de transposón Tn5 (Lee *et al.* 2002).

Sin embargo, se conoce que la bacteria *Pseudomonas tolaasii*, así como *Pseudomonas gingeri* tienen la capacidad de realizar “switch fenotípico”, por lo que puede encontrarse dos tipos de morfología de colonia con características distintas. Estas colonias se clasifican como lisas (smooth) o rugosas (rough) y generalmente predomina la rugosa. Las colonias lisas se caracterizan por ser opacas, mucoides, no fluorescentes, altamente patogénicas para cultivos y capaces de producir tolaasina. De forma contraria, la rugosa es translúcida, no mucoide, fluorescente, no patogénica y debido al “switch” pierde la habilidad de producir la tolaasina. Al cultivar esta bacteria en agar *Pseudomonas* con suplemento CFC (OXOID), predomina la presencia de la colonia lisa debido al contenido de cetrimida que inhibe el crecimiento de la rugosa. Se conoce que el switch también causa cambio en la membrana y la cetrimida causa desorganización de la misma. Sin embargo, es posible que se realice el cambio a la colonia rugosa por mutaciones espontáneas luego de haber establecido un cultivo de colonias lisas. En cuanto a la apariencia, las colonias rugosas se observan en forma babosa mientras que la lisa se observa puntual y circular (Cutri, Macauley y Roberts, 1984) (Sinha, Pain, y Johnstone, 2000).

Figura 3: Morfología de colonias rugosas y lisas de *Pseudomonas tolaasii* y *Pseudomonas gingeri*.

294

S. S. Cutri et al.



(a) Mezcla de colonias rugosas y lisas de *Pseudomonas tolaasii*; (b) colonias rugosas creciendo a partir de colonias lisas de *Pseudomonas tolaasii*; (c) colonias lisas de *Pseudomonas tolaasii*; (d) colonias rugosas de *Pseudomonas tolaasii*; (e) colonias lisas de *Pseudomonas gingeri*; (f) colonias rugosas de *Pseudomonas gingeri*.

(Cutri, Macauley y Roberts, 1984)

2) *Ralstonia solanacearum* (*Pseudomonas solanacearum*).

Anteriormente esta bacteria estaba clasificada dentro del género *Pseudomonas*. Ésta es un bacilo Gram negativo, de mucha importancia por ser patógena de varias plantas y por presentar una serie de razas que afectan a cultivos específicos pero que los afectan con diferentes grados de severidad. Principalmente se encuentra en la tierra (no en ambientes acuáticos) y causa infección en productos agrícolas como tomate, papa, banano y jengibre. Para su identificación han sido descritos primers dirigidos hacia una región del gen 16s ADNr. El primer OLI1, es específico para la especie mientras que el Y2 no muestra tanta especificidad como el anterior y amplifican un fragmento de ~288 pb (Hu *et al.* 2008).

La clasificación taxonómica de esta bacteria es la siguiente (Euzéby, 2001):

- **Reino:** Bacteria
- **Filo:** Proteobacteria
- **Clase:** Beta Proteobacteria
- **Orden:** Burkholderiales
- **Familia:** Burkholderiaceae
- **Género:** *Ralstonia*
- **Especie:** *solanacearum*

d. Reacción en cadena de la polimerasa. La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction, PCR) permitirá determinar la presencia o ausencia de bacterias del género *Pseudomonas*, así como detectar específicamente *Pseudomonas tolaasii*, en muestras de champiñón que presenten la enfermedad del manchado marrón. El PCR, es una técnica que permite crear múltiples copias de un fragmento de ADN específico dentro de una secuencia mucho mayor. Esta técnica utiliza la enzima ADN polimerasa para crear una cadena complementaria a la ya existente. Los principales pasos son la desnaturalización, hibridación y extensión. Una muestra de ADN se mezcla con una alícuota de polimerasa Taq y los cuatro desoxirribonucleótidos, junto con exceso de dos fragmentos de ADN sintéticos que son complementarios a las secuencias ADN en los extremos 3' de la región que quiere amplificarse. Además, la enzima Taq polimerasa requiere de cloruro de magnesio como co-factor para llevar a cabo las reacciones necesarias. Las concentraciones de éste deben ser modificadas para optimizar el proceso y siempre debe encontrarse en una mayor concentración a los desoxirribonucleótidos. La mezcla de estos reactivos se calienta para hacer que las moléculas de ADN se separen en sus dos cadenas. Esto permite que los cebadores se unan con las cadenas del ADN blanco y la temperatura se eleva para que la polimerasa agregue nucleótidos al extremo 3' de los cebadores. Como consecuencia, el segmento de ADN blanco se replica una y otra vez hasta obtener una cantidad específica (Karp, 2005).

Esta técnica requiere de 10 componentes básicos para su funcionamiento, siendo estos: ADN polimerasa termoestable (Taq polimerasa), cloruro de magnesio, oligonucleótidos iniciadores (primers), desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPs), cationes divalentes, ADN molde (templado), adyuvantes de PCR (mejora rendimiento

y especificidad), agua, termociclador, número definido de ciclos, temperatura y tiempos de ciclos. (Karp, 2005) Cada ciclo del PCR consiste en un proceso de inicialización o activación enzimática (94 °C, 2 min.); desnaturalización en la que se separan las hebras de ADN (94 °C, 30 segundos); annealing o hibridización (50-65 °C, 1 min); elongación (72 °C con Taq polimerasa, 15-30 minutos) y terminación (4-10°C) por un tiempo no definido. La desventaja de la técnica de PCR, aunque tiene una gran sensibilidad, es que no permite realizar análisis cuantitativos y se pueden obtener bastantes falsos positivos si no se conoce con exactitud la especificidad de los cebadores. Sin embargo, esta técnica es altamente utilizada debido a que provee resultados en un tiempo reducido (~3 horas) comparado con otras técnicas. Para aumentar la confiabilidad del PCR, se utilizan controles positivos de muestras de ADN, controles negativos y controles internos, que ayudan a descartar los falsos positivos (UBA, 2006).

1) PCR Múltiple. En el PCR múltiplex o múltiple se busca amplificar en un mismo tubo distintas secuencias específicas para el mismo o distinto organismo. En este caso es necesario agregar una mayor cantidad de reactivos para que siempre estén disponibles en el medio y evitar que la amplificación de una secuencia interrumpa la de otra. En esta técnica, debe agregarse "primers" o cebadores para todas las secuencias que se desea amplificar en el mismo tubo. Para esto es necesario escoger cebadores que no interactúen entre sí; que tengan temperaturas de asociación similares; que cada pareja de cebadores amplifiquen una secuencia distinta y que los segmentos amplificados sean suficientemente distintos para luego distinguirlos en la separación (Méndez, 2003).

2. Marco conceptual. La infección de hongos comestibles y la pérdida de cultivos es un problema mundial que ha forzado el desarrollo de nueva tecnología, promoviendo la investigación en torno a esta problemática. En lugares como Inglaterra, Finlandia, Estados Unidos, Costa Rica, Venezuela y México se han hecho estudios específicamente relacionados con la infección del champiñón causada por *Pseudomonas tolaasii*. En el estudio de Godfrey *et al.* (2001), se describe la caracterización de bacterias del género *Pseudomonas* que afectan al champiñón utilizando el gen 16S ARNr para identificarlas. En éste (y muchos estudios) se presenta a *P. tolaasii* como la principal causa del manchado marrón (Godfrey *et al.* 2001). Además existen estudios de caracterización de la proteína tolaasina, en donde han logrado secuenciar el grupo de genes que codifican a esta molécula (Kwang *et al.* 2006). Sin embargo, aun existiendo estudios en países como México, Venezuela y Costa Rica, no hay literatura o reportes que indiquen la presencia de esta bacteria en Guatemala. Sin embargo, sí existen trabajos de investigación que describen el aporte del cultivo de champiñones al país, así como la importancia general de los hongos comestibles. Dentro de algunos trabajos importantes para el conocimiento del cultivo de hongos comestibles y medicinales en Guatemala cabe mencionar el de De León (2003) en una planta productora en la ciudad de Guatemala y a Morales y Arzú (2007) por su trabajo en caracterización y producción de cuerpos fructíferos de *Neolentinus ponderosus* y *N. lepideus* (hongos comestibles cultivados localmente en comunidades guatemaltecas) desarrollado en la Universidad San Carlos de Guatemala.

La producción de hongos comestibles y medicinales en Guatemala inició en los años 1970, cultivando principalmente champiñón, *Agaricus bisporus* (De León, 2003). Además de este hongo, también se cultiva *Pleotrus ostreatus* (hongo ostra) y *Lentilula edodes* (hongo shitake) los cuales son (incluyendo al champiñón) los principales hongos comestibles consumidos y producidos a nivel mundial. En el año 2000, se reportó una producción total de hongos comestibles (peso seco) de 132,104 kg de la cual 68,504 kg (51.9%) corresponde al champiñón, 25.7% al shitake y 22.4% a hongo ostra. De la producción total de champiñón de Guatemala, 30% es exportado y 70% es consumido localmente. Por ejemplo, Costa Rica importa aproximadamente 75.160 kg de hongos comestibles provenientes de Guatemala, México y Colombia (De León, 2003).

En el país, este sector en crecimiento proporcionó a la población guatemalteca un total de 76 empleos durante el año 2008. En el año 2009 también empezaron a

funcionar programas no gubernamentales de desarrollo rural que involucran el cultivo de hongos comestibles: dos en San Marcos y uno en Huehuetenango (De León, 2003). También, lugares como San Juan Sacatepéquez, Sumpango Sacatepéquez, Tecpán Guatemala, Chimaltenango y Quetzaltenango están involucrados en la producción de hongos comestibles tanto a nivel comercial como para consumo local. Aun así, es notable que las condiciones climáticas y ambientales de estos lugares permiten y favorecen el cultivo por lo que podría desarrollarse al máximo y tener una mayor producción de hongos (Morales, 2002).

A nivel de Latinoamérica, se reportó que en un período de 6 años (1995-2000) incrementó en un 32% la producción comercial de hongos comestibles (principalmente champiñón y hongo ostra) aportando un valor de mercado de 167 millones de dólares al año y 34,000 empleos. Se estimó que para el año 2007 alcanzaría un valor de 251 millones de dólares (Morcillo, 2005).

La importancia económica y agrícola del cultivo de hongos comestibles, principalmente el champiñón, *Agaricus bisporus*, hace sumamente importante el desarrollo de tecnología e investigación que hagan más accesible el cultivo de estos hongos. Dentro de estos factores es necesario determinar qué amenazas y riesgos existen, como las bacterias que pueden dañar los cultivos. Aún más importante es determinar si *Pseudomonas tolaasii* u otras especies de este género, las cuales se han identificado como bacterias que destruyen cultivos de champiñones en todo el mundo, son un riesgo presente en Guatemala.

B. Objetivos

1. General:

a. Identificar si bacterias del género *Pseudomonas* son los principales agentes infecciosos de champiñones (*Agaricus bisporus*) que causan el deterioro del champiñón en cultivos en una granja del departamento de Guatemala utilizando la técnica de Reacción Múltiple en Cadena de la Polimerasa (PCR Múltiple).

2. Específicos:

a. Identificar la presencia de bacterias *Pseudomonas tolaasii* y *Pseudomonas* spp. a partir de hongos infectados obtenidos de cultivos de champiñón de una granja del departamento de Guatemala.

b. Optimizar la técnica de Reacción Múltiple en Cadena de la Polimerasa (PCR Múltiple) para detectar *Pseudomonas* spp. y *P. tolaasii* en muestras de champiñón.

c. Relacionar la presencia de bacterias del género *Pseudomonas* en el champiñón, con los síntomas del manchado marrón por medio de bioensayos.

C. Hipótesis

1. Ho: Las bacterias del género *Pseudomonas* no están asociadas a los síntomas de manchado marrón en el champiñón, *Agaricus bisporus*, cultivado en una granja del departamento de Guatemala.

2. Ht: Las bacterias del género *Pseudomonas* están asociadas a los síntomas de manchado marrón en el champiñón, *Agaricus bisporus*, cultivado en una granja del departamento de Guatemala.

II. METODOLOGÍA

Para identificar las bacterias *Pseudomonas tolaasii* y *Pseudomonas* spp a partir de hongos infectados obtenidos de cultivos de champiñón de una granja del departamento de Guatemala, se inició con la selección de la población y la búsqueda de proveedores de muestras de hongos (champiñones) enfermos y sanos.

A. Población

La población analizada fueron los hongos con sintomatología del manchado marrón, obtenidos de una granja de cultivo de champiñones. Se obtuvo muestras únicamente de una granja ya que fue la única que brindó la oportunidad para llevar a cabo la recolección de las muestras. Estos fueron seleccionados de manera no probabilística, siguiendo la sintomatología que presentaron como criterios de inclusión.

1. Síntomas y escala de severidad. Los síntomas observados se presentan en el sombrero como manchas marrones localizadas, hundimiento del sombrero (a un nivel de infección media) y secreción leve de fluido viscoso en el área afectada (a un nivel de infección alto). En este estudio se clasificaron los hongos según los síntomas observados y se realizó una escala propia para la clasificación de los mismos.

Escala de severidad (propia del estudio):

Nivel bajo (1): Un nivel bajo se consideró si se observó únicamente el manchado marrón del sombrero y este fue localizado, es decir, que no cubre completamente el sombrero.

Nivel medio-bajo (2): se consideró un manchado localizado y hundimiento leve del sombrero.

Nivel medio (3): se consideró un manchado amplio del sombrero sin hundimiento.

Nivel medio-alto (4): se consideró un manchado amplio y hundimiento del sombrero.

Nivel alto (5): se consideró un manchado amplio o localizado, con hundimiento del sombrero y presencia de fluido viscoso en el área afectada.

B. Muestra:

Se obtuvo una muestra total de 65 hongos que fueron utilizados para optimizar el método. De estos hongos, 10 se encontraban libres de síntomas y fueron utilizados como control negativo del cultivo de bacterias. Los 55 hongos restantes sí presentaban síntomas. De estos 5 fueron analizados individualmente por el método A (ver sección de aislamiento de bacterias abajo) y los 50 restantes fueron agrupados en 10 grupos de 5 hongos y se procesaron según el método B (ver sección de aislamiento de bacterias abajo). La validación se realizó con una muestra total de 25 hongos adicionales.

C. Variables dependientes e independientes

1. La variable independiente analizada fue la presencia o ausencia de las bacterias en cuestión en los champiñones seleccionados.

2. La variable dependiente analizada fue la severidad de la patología observada, según un índice que mide extensión, profundidad y licuefacción de la lesión. Esta variable depende totalmente de la presencia de la bacteria en el hongo.

D. Procedimiento:

Aislamiento de bacterias a partir de *A. bisporus* infectados.

Los champiñones infectados fueron proporcionados por una granja de producción localizada en el departamento de Guatemala. Debido a limitaciones de acceso a la granja, el proveedor de la muestra extrajo de la producción total de un día, los hongos que presentaron uno o todos los síntomas correspondiente al manchado marrón (manchado anormal de coloración café, mal olor, ruptura del sombrero). Estos fueron transportados al laboratorio, en hielo para evitar la descomposición, en un período no mayor de 2 horas (Godfrey *et al.* 2001 y Bessett, 1984).

Optimización del aislamiento de bacterias:

Se describió la sintomatología encontrada en los champiñones.

Método A:

1. Se tomó una sección (2.5 cm²) del tejido manchado del hongo que presentaba la sintomatología y se colocó en un mortero con 5 ml de agua peptonada estéril (1 muestra por hongo infectado). Luego de macerar suavemente se dejó reposar por 15 minutos a 30°C.

2. Se prepararon diluciones del extracto en tubos de ensayo con agua de peptona estéril, en proporciones 1:10, 1:100, 1:1000. Tomando 50 µl de cada dilución y del extracto puro, se inoculó la superficie de cajas Petri con Agar selectivo *Pseudomonas CFC* (CFC de Oxoid) utilizando un esparcidor. Las cajas se incubaron a 28°C y se observó el crecimiento a las 24 y 48 horas.

3. Se seleccionó la caja correspondiente a la dilución con un conteo intermedio de colonias entre las distintas diluciones y menor de 100 UFC por caja. Se refrigeró a 4°C por un período no mayor a 48 horas, hasta ser utilizadas, sellando las cajas con papel parafilm. Se continuó con el paso 7 de este protocolo.

Método B:

Debido a que no se observó diferencia significativa en cuanto a crecimiento de colonias según dilución, se realizó la siguiente modificación.

4. Se formaron grupos de 5 hongos y se tomó una sección (2.5 cm²) del tejido manchado del hongo con la sintomatología y se colocó en un mortero con 5 ml de agua peptonada estéril (1 muestra por hongo infectado). Se maceró suavemente.

5. Se tomó un volumen del macerado y se inoculó la superficie de cajas Petri con Agar selectivo *Pseudomonas CFC* (CFC de Oxoid) utilizando un esparcidor. Las cajas se incubaron a 28 °C y se observó el crecimiento a las 24 y 48 horas.

Nota: para poder determinar el volumen adecuado se probó inoculando 10 y 20 µl. Luego de observar los resultados se procedió a utilizar 20 µl ya que estos cultivos presentaban colonias que no se observaron en los inóculos con 10 µl.

6. Todas las colonias se caracterizaron y clasificaron según su morfología y características físicas (color, consistencia, etc.). Se verificó su morfología con la coloración de Gram.

7. Una colonia de cada tipo se extrajo de las cajas seleccionadas y se inoculó 1.5 ml de agua de peptona y se utilizaron en la prueba de patogenicidad.

8. Una colonia de cada tipo se re-aisló en agar sin suplemento CFC. Una vez aislada y purificada, se inoculó en un tubo con 1.5 ml de caldo nutritivo con 20% glicerol. Estas muestras se almacenaron a -40 °C hasta ser utilizadas para la extracción de ADN.

9. En este procedimiento, además de analizar las muestras infectadas, también se analizaron muestras que no presentaron síntomas del manchado marrón (hongos sanos) siguiendo el protocolo establecido previamente para establecer un control negativo.

Procedimiento para las pruebas bioquímicas e identificación de colonias.

1. Tinción Gram:

a. Se fijó un frote sobre un porta objetos utilizando la colonia a observada.

b. Se agregaron 3 a 5 gotas de la tinción Cristal violeta sobre el frote y se dejó teñir durante un minuto. Luego se lavó inmediatamente con agua de grifo dejando fluir el agua desde un extremo hasta el otro, evitando que el chorro caiga directamente sobre el frote.

c. Se agregó 3 a 5 gotas de lugol sobre el frote y se dejó teñir durante un minuto. Se repitió el lavado al finalizar.

d. En un extremo del porta objeto se dejó caer 2 a 3 gotas de alcohol-acetona para dejarlo fluir sobre el frote. Esto se lavó inmediatamente para evitar la decoloración completa.

e. Finalmente se agregó tinción Safranina durante un minuto y al finalizar se repitió el lavado.

2. Prueba de Oxidasa:

a. En un papel filtro se agregó 2-3 gotas de reactivo Kovacs (1% de diclorhidrato de tetramil-p-fenilendiamina).

b. Con el asa circular se tomó una colonia y se extendió sobre el papel en el área impregnada con el reactivo.

c. Se observó durante 10-15 segundos si se daba el cambio de coloración.

d. Se considera un resultado positivo si la inoculación cambia al color morado y negativo si el cambio no se produce durante los primeros 20 segundos.

3. Prueba Oxidación-Fermentación (OF)

a. Preparación del medio

1) Se disolvió 1.1 g de medio OF (Oxoid) en 90 ml de agua destilada, calentando hasta obtener una coloración brillante y traslúcida.

2) Se esterilizó el medio en autoclave.

3) Se disolvió 1.0 g de glucosa en 10 ml de agua destilada estéril.

4) Una vez el medio OF alcanzó una temperatura aproximada de 50 °C se agregó los 10 ml de glucosa (utilizando un mechero para mantener un ambiente estéril).

5) Se vertió 3 ml en tubos de ensayo y se almacenó a 4 °C hasta ser utilizados.

b. Prueba

1) Se utilizó dos tubos con medio OF por colonia a analizar.

2) Se sembró la colonia en los dos tubos OF por picadura hasta aproximadamente la mitad de la altura del medio (en el tubo).

3) A uno de los tubos se agregó 1 ml de aceite mineral en la superficie del medio para evitar el contacto con el aire.

4) Ambos tubos se colocaron en incubación a 30 °C y se evaluó los cambios a las 24 y 48 hrs.

5) Se observó el cambio del color verde al amarillo para considerarla una prueba como: fermentativa si el tubo que cambió es el que contiene aceite mineral; y oxidativa si cambió únicamente el que no contiene aceite mineral. Si ambos cambiaron, la bacteria tiene capacidades oxidativas y fermentativas.

4. Crecimiento en YDC

a. Se picó una colonia con un asa circular y se inoculó en una caja con agar YDC estriando únicamente un extremo de la caja. Se esterilizó el asa con el mechero y se frotó una vez, rápidamente sobre el extremo previamente inoculado en dirección a un extremo no inoculado. Este paso se repitió (esterilizando y estriando desde el último segmento inoculado) hasta completar la inoculación en todas las áreas del agar, evitando el contacto con áreas previamente inoculadas.

b. Se evaluó el crecimiento de la colonia según el color y morfología que mostraron. Las bacterias del género *Pseudomonas* crecen con un color crema o blanco opaco.

5. Fluorescencia en medio KB

a. Se siguió el procedimiento indicado para siembra en medio YDC. Se observó el crecimiento y fluorescencia.

b. Las bacterias del género *Pseudomonas* sí crecen en este agar y la mayoría presenta fluorescencia. Algunas excepciones son *Pseudomonas solanacearum*, y la forma lisa (smooth) de *Pseudomonas tolaasii* (Cutri, Macauley y Roberts, 1984) (Sinha, Pain, y Johnstone, 2000)

6. Prueba de pudrición de la papa (para descartar la presencia de *Erwinia carotovora*).

a. Se cortó una rodaja de aproximadamente 1 cm de ancho de papa utilizando un chuchillo estéril.

b. Se cortó un cubo de aproximadamente 1 cm x 1 cm del centro de la rodaja y se agregó 2 gotas de agua al espacio donde se encontraba el cubo en la rodaja.

c. Con el asa circular, se picó la colonia deseada y se frotó en la rodaja de papa, dentro del agujero sin tocar las orillas de éste.

d. Se dejó en cámara húmeda (caja Petri con 80 ul de agua destilada estéril) a temperatura ambiente y se observó la pudrición a las 24 y 48 horas.

Extracción de ADN:

1. 5 ml de los cultivos seleccionados se centrifugaron a 2500 r.p.m. por 10 minutos y el pellet se agregó al buffer de lisis del kit QIAamp DNA Mini Kit (número en catálogo: 51304).

2. Para la extracción de ADN se utilizó el kit de extracción QIAamp DNA Mini Kit, de marca QIAGEN (número en catálogo: 51304) y se siguió el procedimiento indicado para procesar muestras de bacterias en suspensión en medio de cultivo.

3. El ADN extraído se almacenó a -20°C hasta ser utilizado.

4. Para analizar las muestras directamente del macerado del hongo, sin aislamiento de la bacteria, se procesó las muestras de la misma manera: siguiendo el procedimiento indicado para bacterias en suspensión.

Reacción múltiple en cadena de la polimerasa (PCR): (Roche, 2008)

1. Controles positivos: para comprobar el funcionamiento del método, se utilizó una cepa de *Pseudomonas marginalis* y una de *Pseudomonas aeruginosa* obtenidas del Laboratorio de Fitopatología de la UVG y el laboratorio de docencia de Microbiología del departamento de Bioquímica, respectivamente.
2. Análisis de muestras: Se limpió previamente con etanol (EtOH) al 70% toda la campana de trabajo y se colocó dentro de la misma: descarte de puntas, pipetas, puntas y tubos Eppendorf (si lo requiere una mini centrifuga y un vortex).
3. Se utilizó el kit QIAGEN Multiplex PCR Kit (no. en catálogo: 206143). Este kit incluye un Master Mix 2X compuesto por ADN polimerasa HotStarTaq®, buffer para PCR Multiplex (concentración inicial 6 mM MgCl₂) y dNTP's.
4. Todos los materiales y reactivos del PCR se mantuvieron en bloque de hielo.
5. La mezcla matriz o master mix se realizó en tubos Eppendorf adecuados a la cantidad total de muestra dependiendo del volumen total escogido (50 µl de reacción). Abajo se presentó el cuadro con la descripción de los reactivos, las concentraciones finales necesarias para la reacción y el volumen que se utilizará.

Cuadro 1: Concentración final y volumen a utilizar de los reactivos para PCR.

	Reactivo	Conc. final	n=1
1	Master buffer (HotStarTaq Multiplex PCR Kit, QIAGEN).	1X (3 mM MgCl ₂)	25 µl
2	Primer Mix 10X (2 mM/primer)	0.2 uM/primer	5 µl
3	Muestra ADN	<1ug ADN/50 µl	1 µl
4	Agua para PCR	--	19 µl
Total			50 µl

Debido a que en un PCR de reacción Múltiple se agregan distintos cebadores en la misma mezcla, es importante que éstos generen productos de tamaños fácilmente distinguibles y temperaturas de fusión (TM) similares. El cuadro siguiente presenta la

secuencia, especie y fragmento que amplifican, así como distintas características de los cebadores utilizados.

Cuadro 2: Secuencia de "primers" o cebadores utilizados.

Especie	Nombre	Primer	Fragmento	Largo (pb)	%GC	TM (°C)	Amplificación esperada (pb)	Referencia
<i>Ps. tolaasii</i>	Pt-1A(f)	ATCCCTTCGGCGT TTACCTG	Tolaasina	20	55	54	449	Lee <i>et al.</i> 2002.
	Pt-1D1(r)	CAAAGTAACCCTG CTTCTGC		20	50	52		
<i>R. solanacearum</i>	OLI1(f)	GGGGGTAGCTTGC TACCTGCC	16S	21	66.7	60	292	Chavarro 2006.
	Y2(r)	CCCCTGCCTCCC GTAGGAGT		21	66.7	60		
<i>Ps. spp.</i>	PS1 (f)	ATGAACAACGTTT TGAAATTCTCTGCT	Gen <i>OprI</i> , lipoproteína mayor de membrana externa.	27	37	55	270	DeVos 1997.
	PS2(r)	CTTGCGGCTGGCT TTTTCCAG		21	57.1	56		
<i>R. solanacearum</i>	759 (f)	GTCGCCGTCAACT CACTTTCC	Epl gene endoglucanasa	21	57.1	58.5	282	Rodríguez 2007.
	760 (r)	GTCGCCGTCAGCA ATGCGGAATCG		24	62.5	64.7		
<i>Ps. spp.</i>	Pseudo sp. 1(f)	CTACGGGAGGCA GCAGTGG	16S	21	65		150	Purohit 2003.
	Pseudo sp. 2 (r)	TCGGTAACGTCAA AACAGCAAAGT		24	41.7			

6. Luego de mezclar vigorosamente, se hicieron alícuotas de 50 μ l de la mezcla matriz en tubos eppendorf de 0.2 ml, según la cantidad de muestras.
7. Como control negativo, se agregó a un tubo 1 μ l de H₂O para PCR.
8. Se centrifugaron las mezclas a máxima velocidad por 30 segundos.
9. Se agregó 1 μ l de la muestra a cada tubo de 0.2 ml para PCR. Luego se cerraron los tubos.
10. Se centrifugaron a máxima velocidad por 30 segundos todos los tubos y se colocaron en el termociclador.

El programa para PCR se describe en el siguiente cuadro. El termociclador utilizado es marca Eppendorf, modelo Mastercycler *Pro S*:

Cuadro 3: Programa para PCR Múltiple

Temperatura (°C)	Proceso	Tiempo	Ciclos
95	Activación	15 min	1
94	Desnaturalización	30 s	
60	Anillamiento	90 s	35
72	Elongación	90 s	
72	Elongación final	10 min	1
4	---	Hold	---

11. Al finalizar el programa, se verificó la amplificación de productos de PCR, utilizando electroforesis en gel de agarosa, de fragmentos correspondientes a las secuencias blanco de los cebadores o *primers*.

12. Las condiciones iniciales para la electroforesis fueron: gel de agarosa 2%, 30 minutos a 100 voltios (voltaje constante).

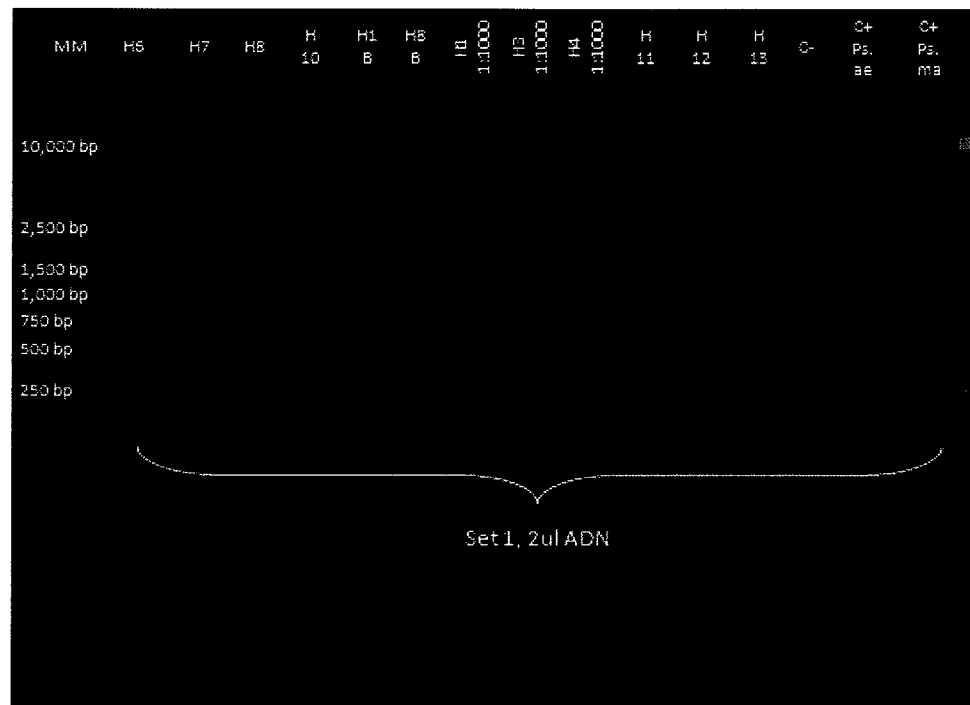
13. Los tubos con los productos de PCR se almacenaron a -20°C.

14. Se analizaron los fragmentos obtenidos y se reportó si se encontró fragmentos correspondientes a *P. tolaasii* y *Pseudomonas* spp.

15. Algunas muestras positivas para *P. tolaasii* se enviaron a secuenciar para poder verificar que lo que se está identificando es lo que se deseaba y para poder determinar la similitud de la secuencia encontrada en Guatemala con las otras reportadas en otras partes del mundo.

16. La optimización del PCR múltiple para este estudio se realizó siguiendo distintas modificaciones en el set de cebadores utilizados, el volumen de ADN a agregar, la temperatura de "annealing" y el número de ciclos del programa de PCR. El "Primer Set" indica la mezcla de cebadores o "primers" utilizados en la reacción. El "Primer Set 1" corresponde a la mezcla de los primers: Pt-1A, Pt-1D1, OLI-1, Y2, PS1 y PS2. El "Primer Set 2" corresponde a la mezcla de primers: Pt-1A, Pt-1D1, 759, 760, Pseudosp.1 y Pseudosp.2. La siguiente figura muestra el PCR realizado bajo las condiciones establecidas inicialmente y evaluado con 2 ul de ADN y cada uno de los sets de cebadores o "primers". Este PCR fue realizado con controles positivos y las muestras H1, H2, H4, H5, H6, H7, H8, H10, H11, H12, H13, H1B, H8B, H1 (1:1000), H3 (1:1000) y H4 (1:1000). El PCR optimizado puede observarse en resultados.

(Continuación de Figura 4)



Para relacionar la presencia de bacterias del género *Pseudomonas* en el champiñón, con los síntomas del manchado marrón se utilizó bioensayos para demostrarlo siguiendo la metodología que a continuación se presenta:

Prueba de patogenia en *A. bisporus* (Godfrey *et al.* 2001)

1. Para realizar la prueba de patogenia se utilizó champiñones frescos y empacados comercialmente, comprados en un supermercado.
2. Se cortó cubos de 1 cm³ del sombrero de hongos sanos y se colocaron en cajas Petri (4 cubos por caja) sobre papel filtro (50mm) húmedo con 800 µl de agua doble destilada estéril. Cuatro cubos se colocaron a 2 cm de distancia (para evitar contaminación cruzada).
3. A uno de los cubos se agregó 50 µl de agua de peptona sin inóculo (control negativo) y a los otros tres se agregó agua de peptona con inóculo de las colonias purificadas (1 colonia por cubo).
4. Se selló las cajas con "parafilm" y se incubaron a condiciones ambientales por 24 horas. Al finalizar se observó si los cubos presentaron manchado o coloración marrón debido al crecimiento bacteriano, esto se consideró un resultado positivo de que las bacterias causan los síntomas en el champiñón.

5. Este bioensayo solamente se realizó una vez con la primera caja Petri seleccionada. Las colonias se caracterizaron y según éstas se seleccionó de las otras cajas colonias con las mismas características (identificándolas también como patógenas).

E. Análisis estadístico:

La primera parte del estudio es de tipo caso-control. En este estudio se llevó a cabo la evaluación de hongos infectados y la presencia del patógeno en éstos y se comparó contra un grupo control de hongos sanos. La segunda parte, el bioensayo, es de tipo experimental.

1. Selección de muestra. Los champiñones enfermos fueron proporcionados por una granja de cultivos en Guatemala, sin embargo, debido a políticas de empresa éstos fueron recolectados por trabajadores del lugar. De la población de hongos enfermos, se tomó una muestra representativa determinando el tamaño haciendo uso del calculador en línea OpenEPI Sample Size Calculator (Kelsey *et al*, 2009).

La muestra fue seleccionada de manera no probabilística pero aleatoria. Esto se debe a que el proveedor de las muestras seleccionó únicamente los hongos infectados de una muestra total, sin tomar en cuenta hongos que no presenten estos síntomas. De este grupo de hongos infectados, el proveedor entregó una muestra seleccionada al azar del grupo total. Los controles seleccionados se obtuvieron de muestras comerciales que no presentaban el manchado marrón y de secciones interiores en donde la probabilidad de que la bacteria se presente es mínima. Para determinar el tamaño de muestra se utilizó un calculador en línea de muestras caso-control. En el Cuadro 4 se presentan los parámetros utilizados para evaluar el tamaño de muestra.

Cuadro No 4: Cálculo de muestra: "OpenEPI Sample Size Calculator".

Parámetro	Valor
Nivel de confianza	0.05
Potencia (% de probabilidad de detección)	90
Proporción de controles expuestos	0.4
Razón controles/casos	0.2
Proporción de casos expuestos	1
Muestra de casos	12
Muestra de controles	2.4

(Kelsey et al, 2009)

2. Análisis de resultados. Prevalencia de la bacteria en hongos infectados: Una vez obtenidos los resultados del PCR (presencia o ausencia de *P. tolaasii* o *Pseudomonas* spp.), se aplicó una prueba de proporciones binomiales para determinar la proporción de *Pseudomonas tolaasii* en relación a otras bacterias encontradas y la proporción de *Pseudomonas* patogénicas en relación a otras bacterias no patogénicas presentes en la población de hongos infectados de la granja de la cual se tomaron. Esto se realizó utilizando el software Microsoft Excel. Esta prueba permitió determinar si las bacterias del género se encuentran en mayor proporción a otras bacterias aisladas. Esta prueba es aplicable debido a que las colonias aisladas pueden ser clasificadas como *Pseudomonas* patogénicas y no patogénicas o como *Ps. tolaasii* y no *Ps. tolaasii*. De esta manera es posible determinar la proporción en la que cada individuo cae en una categoría particular. La forma de calcular la proporción binomial se describe de la siguiente manera (Roche, 2008):

Suponiendo que de n individuos o unidades, r son positivos para la característica de interés y z (1.96) corresponde a un intervalo de confianza de 95%, la proporción de respuestas positivas se describe como:

$$p = \left(\frac{r}{n} \right)$$

El intervalo de confianza correspondiente a dicha proporción se calcula de la siguiente manera:

$$A = 2r + z^2$$

$$B = z \sqrt{\left[z^2 + 4r \left(1 - \left(\frac{r}{n} \right) \right) \right]}$$

$$C = 2 \left(n + z^2 \right)$$

$$\left[\left(\frac{A-B}{C} \right), \left(\frac{A+B}{C} \right) \right]$$

(Roche, 2008)

Severidad de síntomas asociados a *Pseudomonas tolaasii* y *Pseudomonas* spp.: Para realizar esto y poder asociar la patogenicidad y la bacteria identificada, se aplicó una prueba Fisher's exact ó Prueba de contingencia. En esta prueba se compararon bacterias identificadas como *Pseudomonas* y el resultado obtenido de la prueba de patogenicidad. Esta prueba permite determinar la significancia estadística de una tabla de contingencia en la que se plantean dos condiciones (ej: patogenicidad vs *Pseudomonas*) con sus alternativas (positivas y negativas), y es aplicable a muestras pequeñas (Lowry, 2010), como es el caso en este estudio. Esta prueba estadística plantea como hipótesis nula que no hay asociación entre las bacterias del género *Pseudomonas* y la patogenicidad observada en el hongo sano luego de ser inoculada con éstas. Al aplicar la prueba se desea aceptar la hipótesis de trabajo.

III. RESULTADOS

A. Descripción

1. Sintomatología observada en hongos infectados (ver escala de severidad en metodología, pp. 19).

Todos los hongos utilizados en el estudio presentaron síntomas desde un nivel bajo hasta un nivel alto, con excepción de los controles negativos que eran asintomáticos. El siguiente cuadro indica el número de hongos clasificados bajo cada nivel de síntomas según la escala de severidad planteada.

Cuadro 5: Número de hongos clasificados según la escala de severidad de los síntomas (ver escala de severidad en metodología) antes de realizar el aislamiento.

Número de hongos clasificados según la escala de severidad de los síntomas presentados antes de realizar el aislamiento bacteriano.					
Sin síntomas	Bajo	Medio-bajo	Medio	Medio-alto	Alto
10	3	4	12	21	15
Total: 65 hongos					

Nota: la muestra total fue analizada en "pools" de 5 hongos.

2. Morfología de colonia. El Cuadro 7 muestra la morfología observada en las colonias aisladas a partir de hongos infectados. Para llevar a cabo el bioensayo y PCR múltiple se utilizaron estas colonias. Se puede observar que en algunos casos hay más de una colonia del mismo tipo que fue analizada. Esto se debe a que en la caja inicial, con todas las colonias, éstas parecían tener características distintas pero al momento de aislarlas se observó que mostraban el mismo crecimiento y características bioquímicas.

Nota: se denominó "colonias de trabajo" a las colonias a las que se hace referencia con los códigos respectivos presentados en el Cuadro 6.

Cuadro 6: Morfología de colonias aisladas en agar *Pseudomonas* con suplemento CFC (OXOID) incluidas en bioensayo y PCR.

Morfología y características observadas en colonias aisladas en agar <i>Pseudomonas</i> CFC a partir de hongos infectados.							
Código de Colonia	Diámetro	Forma	Margen	Color	Elevación	Pigmento del Agar	Textura/ aroma
<i>Ps. aeruginosa</i>	~3 mm	Irregular	ondulado	blanca, brillante	plana	verde-anaranjado fluorescencia	mucoide/ distintivo Ps.
H2 (1:1000)	~2 mm	circular	entero	blanca opaca.	elevada	sin pigmento	húmeda
H1 (1:1000)	~4-5 mm	circular	entero	rosada, brillante	elevada	sin pigmento	húmeda/ ácido
H4 (1:1000)							
H3 (1:1000).	~3 mm	circular	entero	Levemente verde, traslúcida.	elevada	pigmento verde-anaranjado. fluorescencia.	mucoide
H1, H2, H3, H6, H7, H10.	~4-6 mm/ dispersa	circular/irregular	ondulado	amarilla-blanca, bordes traslúcidos	elevada	sin pigmento	húmeda
H5, H4, H9	~3 mm/ dispersa	irregular	ondulado	amarilla-blanca traslúcida amarilla –	plana	sin pigmento	seca, rugosa
H1B	~3 mm	circular	entero	blanca opaca	elevada	amarillo-anaranjado fluorescencia	mucoide
H8, H8B	~3 mm	circular	ondulado	blanca-amarilla, opaca.	elevada	leve color amarillo fluorescencia	mucoide
H11, H12, H13.	~1-2 mm	circular	entero	amarilla blanca opaca	elevada	leve color amarillo/anaranjado	mucoide
C1-C10	~2-3mm	circular	entero	blanca opaca	elevada	sin pigmento	húmeda

3. Pruebas bioquímicas y de cultivo. El siguiente cuadro muestra los resultados obtenidos de la caracterización bioquímica de las colonias aisladas a partir de hongos con síntomas del manchado marrón.

Cuadro 7: Pruebas bioquímicas aplicadas a colonias aisladas de hongos infectados y controles sanos.

Pruebas bioquímicas aplicadas a las distintas colonias aisladas en agar Pseudomonas CFC a partir de hongos infectados y controles sanos que fueron utilizadas en PCR										
Código de Colonia*	Tinción Gram	Morfología**	Movilidad	Oxidasa	Crecimiento Ps.CFC	OF***	KB	Fluorescencia	Crecimiento YDC	Pudrición de Papa
<i>Ps. aeruginosa</i>	-	bacilos cortos	+	+	+	O	+		blanca, puntiforme	-
H2 (1:1000)	-	bacilos cortos	-	-	+	/	-		/	/
H1 (1:1000)	-	bacilos	+	v	+	OF	-		rosada intensa	-
H3 (1:1000)	-	bacilos largos	+	+	+	O	+		blanca	-
H1	-	bacilos	+	-	+	OF	-		amarilla	-
H2	-	bacilos	+	-	+	OF	-		amarilla	-
H3	-	bacilos y cocos	-	-	+	OF	-		amarilla	-
H4	-	bacilos cortos	+	-	+	OF	-		blanca	-
H5	-	bacilos y cocos	-	-	+	/	-		amarilla-café	-
H6	-	bacilos	+	+	+	OF	-		blanca	-
H7	-	bacilos	-	-	+	OF	-		blanca	-
H8	-	bacilos y bacilos cortos	+	+	+	O	+		blanca	-
H9	-	bacilos y cocos	-	-	+	/	-		amarilla	-
H10	-	bacilos largos	-	-	+	/	-		blanca	-

*Se muestra la descripción de una colonia de cada tipo encontrado en la muestra total de 65 hongos. **El tamaño de los bacilos es relativo y comparable únicamente entre los observados en este estudio. Cabe mencionar que el largo promedio de *Ps. tolaasii* es de 1.5 a 3 micrómetros. ***Las muestras que tienen un signo diagonal (/) indican que no se realizó esta prueba, y una "v" significa resultado variable. En la prueba de oxidación/fermentación el resultado "O" significa que la colonia es oxidativa; el resultado "F" es fermentativa, y "OF" es tanto oxidativa como fermentativa.

(Continuación Cuadro 7)

Código de Colonia	Tinción Gram	Morfología	Movilidad	Oxidasa	Crecimiento Ps.CFC	OF**	KB	Fluorescencia	Crecimiento YDC	Pudrición de Papa
H1B	-	bacilos cortos gruesos y largos	+	+	+	O	+		blanca/punti forme	-
H8B	-	bacilos cortos gruesos y largos	+	+	+	O	+		blanca/punti forme	-
H11, H12, H13.	-	bacilos cortos y gruesos	+	+	+	O	-		blanca/crema	-
C1, C2	-	bacilos cortos	-	-	+	/	-		/	/

**Las muestras que tienen un signo diagonal (/) indican que no se realizó esta prueba, y una "v" significa resultado variable. En la prueba de oxidación/fermentación el resultado "O" significa que la colonia es oxidativa; el resultado "F" es fermentativa, y "OF" es tanto oxidativa como fermentativa.

B. PCR-múltiple

1. Optimización. Las condiciones óptimas del PCR múltiple para la detección de bacterias patógenicas del género *Pseudomonas* y la especie *Pseudomonas tolaasii* se encuentran en el Cuadro 8. El programa óptimo para llevar a cabo el PCR múltiple se indica en el Cuadro 9.

Cuadro 8: Condiciones óptimas del PCR múltiple para la identificación de bacterias del género *Pseudomonas* y la especie *Pseudomonas tolaasii*.

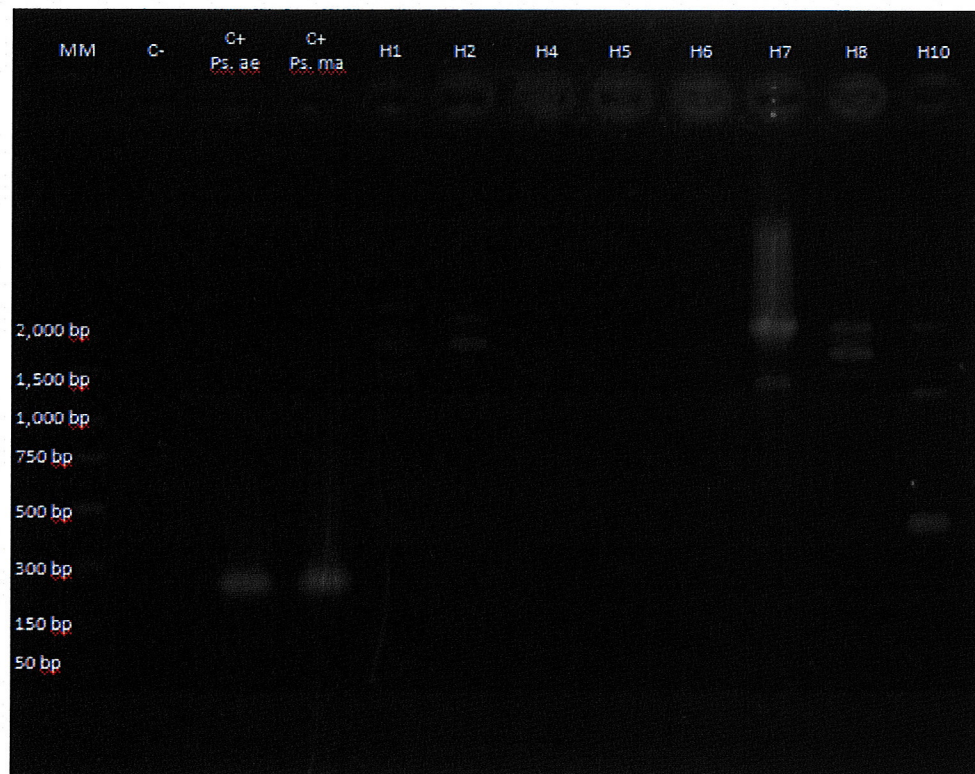
	Reactivo	Conc. Final	n=1
1	Master buffer (HotStarTaq Multiplex PCR Kit, QIAGEN).	1X (3 mM MgCl ₂)	25 µl
2	Primer Set 1 10X (2 mM/primer)	0.2 µM/primer	5 µl
3	Muestra ADN	<1µg ADN/50 µl	2 µl
4	Agua para PCR	--	18 µl
Total			50 µl

Cuadro 9: Programa óptimo del termociclador para llevar a cabo el PCR múltiple para la identificación de bacterias del género *Pseudomonas* y la especie *Pseudomonas tolaasii*.

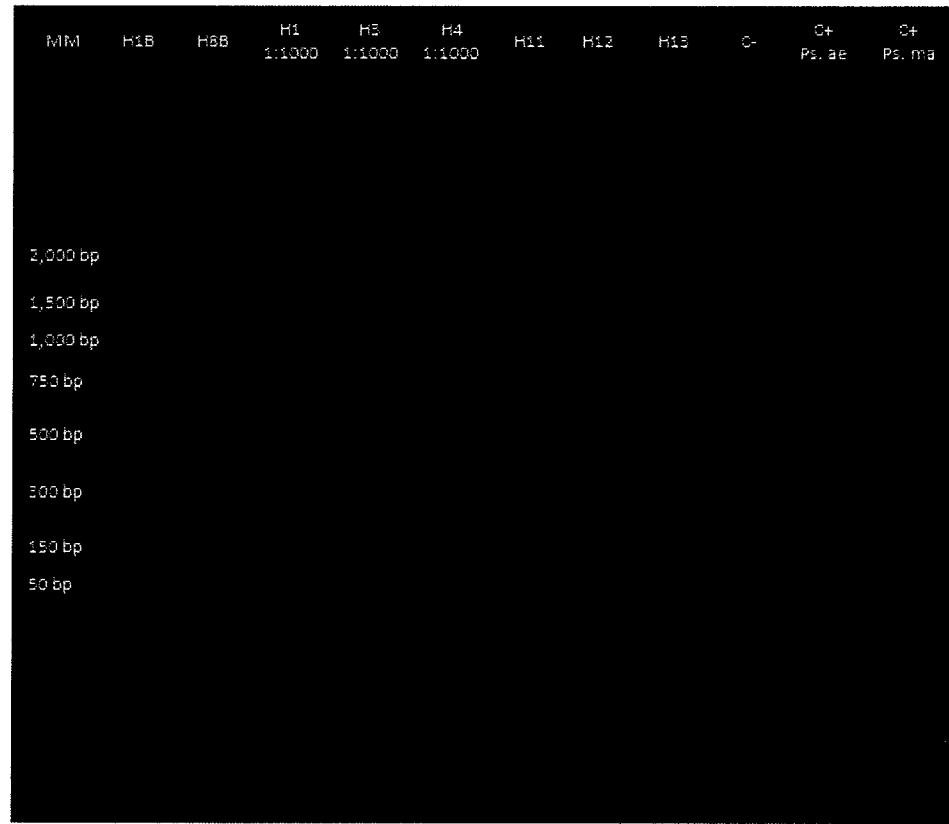
Temperatura (°C)	Proceso	Tiempo	Ciclos
95	Activación	15 min	1
94	Desnaturalización	30 s	
58	Anillamiento	90 s	30
72	Elongación	90 s	
72	Elongación final	10 min	1
4	---	Hold	---

El resultado del gel de agarosa obtenido a partir del PCR múltiple luego de aplicar las modificaciones necesarias se presenta en la Figura 5.

Figura 5: PCR múltiple optimizado para la identificación de bacterias del género *Pseudomonas* y la especie *Pseudomonas tolaasii*.



(Continuación Figura 5)



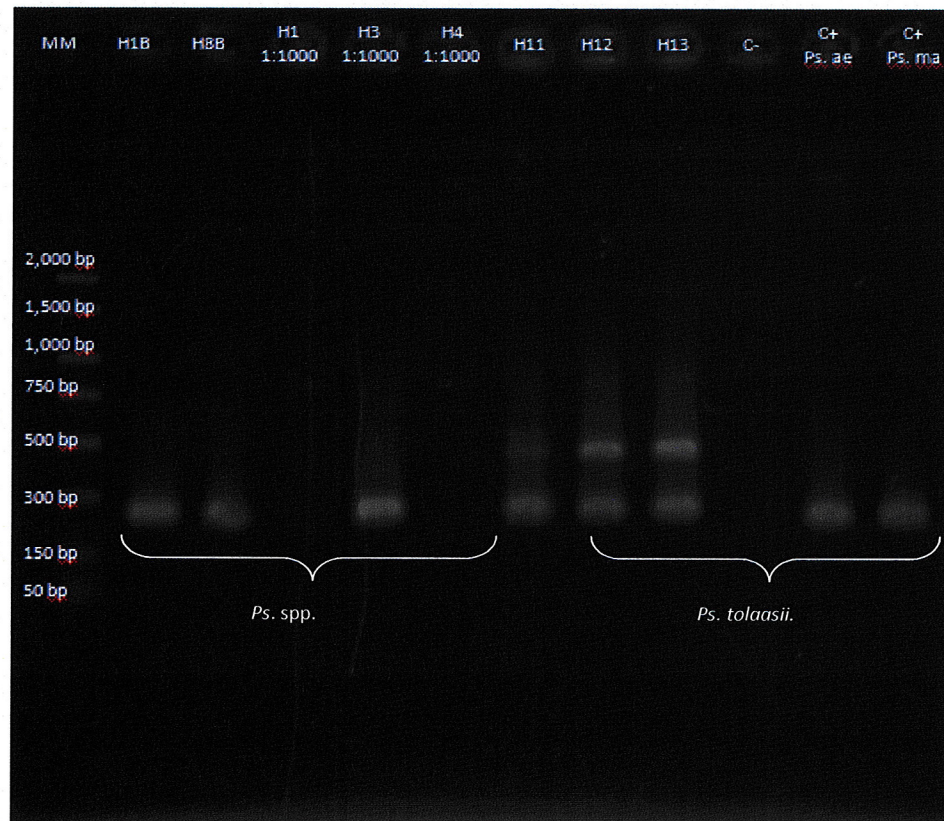
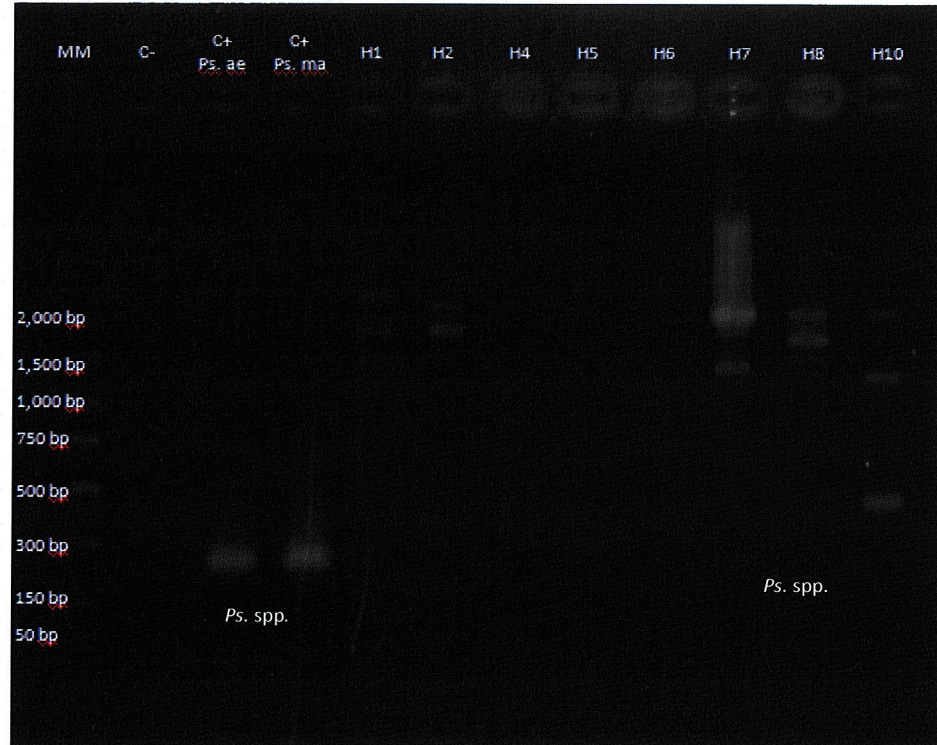
2. Identificación de bacterias del género *Pseudomonas*, patogénicas para el hongo *A. bisporus*, utilizando la técnica de PCR-múltiple. Las muestras identificadas como H8, H1B, H8B, H3 (1:1000), H11, H12 y H13 fueron secuenciadas por Eton Bioscience Inc, en San Diego, California. De estas secuencias, se identificó a H11, H12 y H13 como *Pseudomonas tolaasii*, debido a la amplificación del gen involucrado en la producción de la proteína tolaasina. Las muestras H8, H1B, H8B y H3 (1:1000) fueron identificadas como *Pseudomonas* spp. debido a que se amplificó el gen OprI que codifica una lipoproteína mayor externa de superficie, presente en todas las bacterias del género. Las secuencias de cada una de las muestras fueron comparadas entre ellas para determinar la región homóloga. Se obtuvo una secuencia idéntica para las tres muestras identificadas como *Pseudomonas tolaasii* y una secuencia idéntica para las muestras identificadas como *Pseudomonas* spp. Esto se realizó utilizando el programa Chromatogram Explorer v3.0.0, de HeracleSoftware (ver secuencia y BLAST en anexo B). El Cuadro 10 muestra los tamaños de banda observados en gel de agarosa 1.5% y la identificación de cada colonia según la interpretación de las bandas.

Cuadro 10: Tamaños de banda obtenidos en distintas colonias aisladas a partir de hongos con síntomas del manchado marrón, utilizando PCR múltiple.

Tamaños de banda obtenidos en distintas colonias aisladas a partir de hongos con síntomas del manchado marrón, utilizando PCR Múltiple.		
Código de Colonia	Tamaño de banda	Identificación
H1	--	No ID
H2	--	No ID
H3	--	No ID
H4	--	No ID
H5	--	No ID
H6	--	No ID
H7	--	No ID
H8	270 pb	<i>Pseudomonas</i> spp.
H9	--	No ID
H10	--	No ID
H1 (1:1000)	--	No ID
H3 (1:1000)	270 pb	<i>Pseudomonas</i> spp.
H4 (1:1000)	--	No ID
H1B	270 pb	<i>Pseudomonas</i> spp.
H8B	270 pb	<i>Pseudomonas</i> spp.
H11	270 pb y 449 pb	<i>Pseudomonas tolaasii</i>
H12	270 pb y 449 pb	<i>Pseudomonas tolaasii</i>
H13	270 pb y 449 pb	<i>Pseudomonas tolaasii</i>

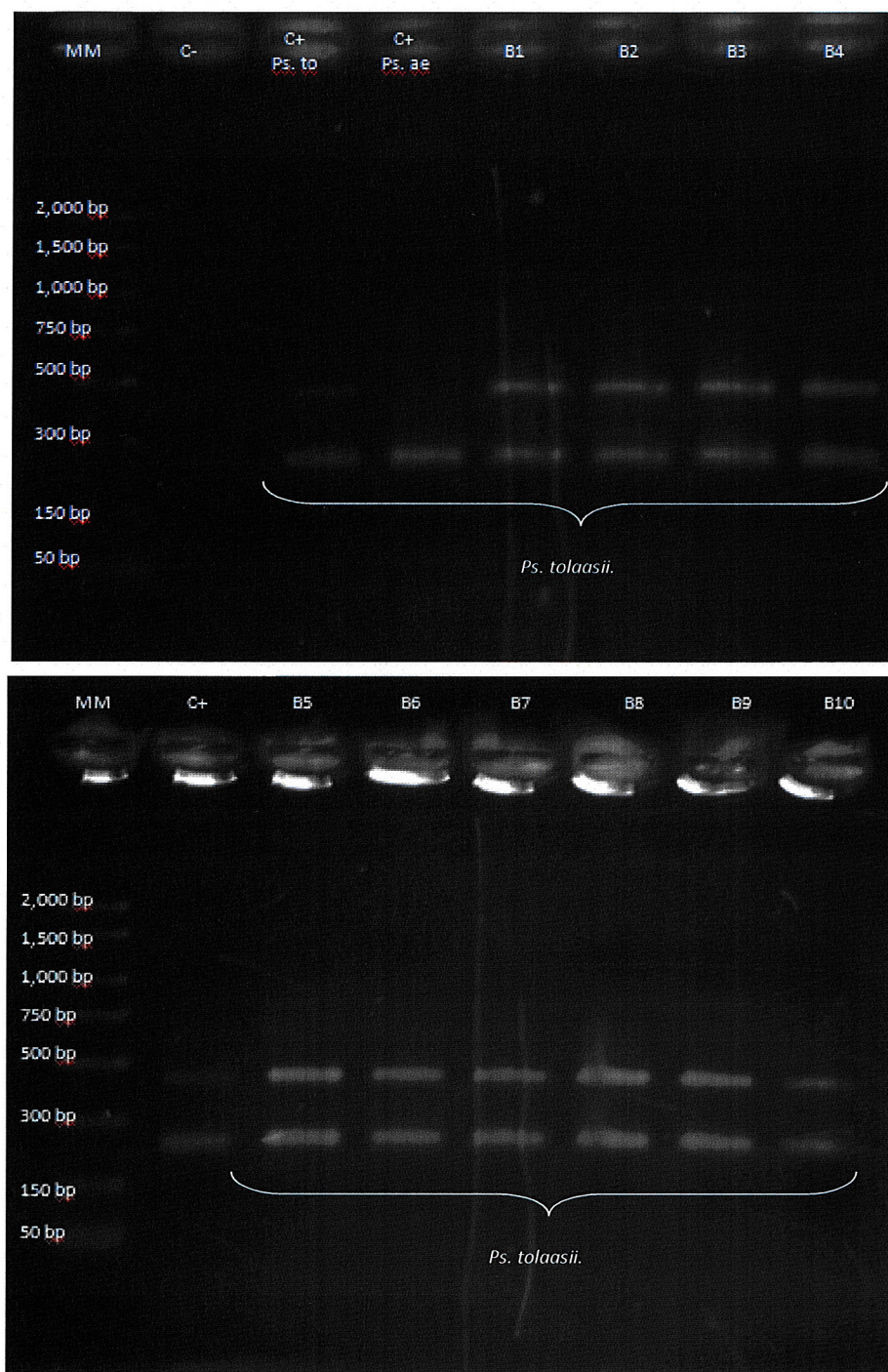
Estos resultados pueden ser visualizados en la Figura 6, en la cual se indican las colonias aisladas a partir de hongos con síntomas de manchado marrón y sus respectivos resultados de amplificación por PCR múltiple para identificación de *Pseudomonas* spp y *Pseudomonas tolaasii*.

Figura 6: PCR múltiple de colonias aisladas a partir de champiñones con síntomas del manchado marrón. En las figuras se indican las colonias identificadas como *Pseudomonas* spp y *Pseudomonas tolaasii*.



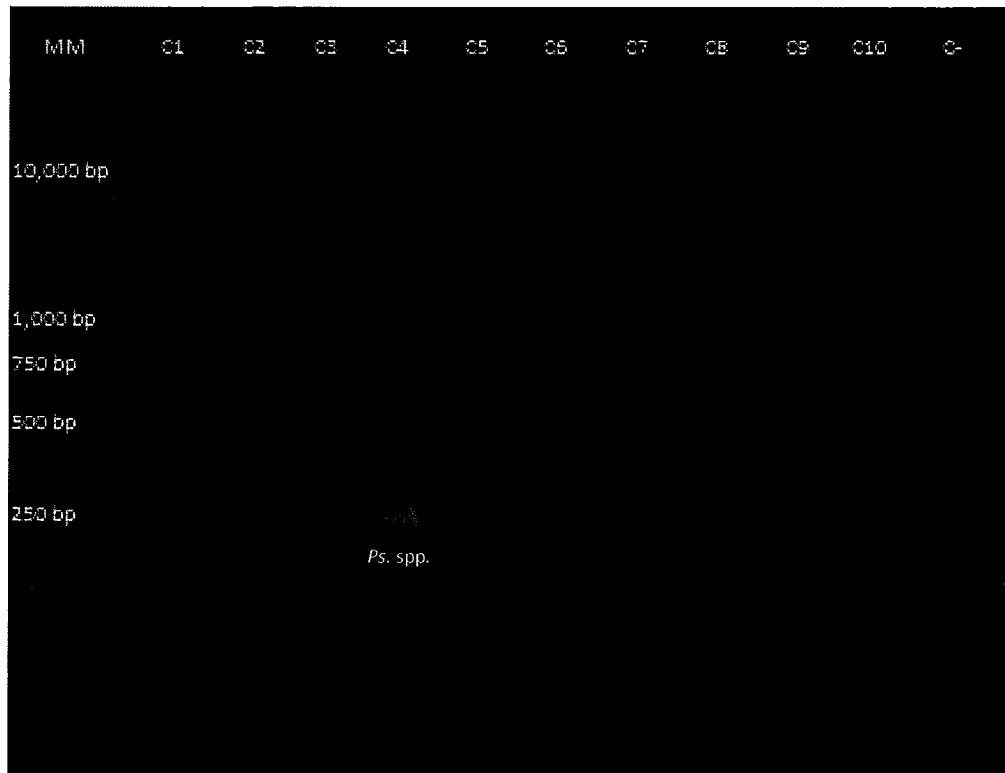
3. Identificación de bacterias patogénicas del género *Pseudomonas* a partir de muestras de hongos infectados, sin llevar a cabo aislamiento y cultivo de las mismas (Figura 7).

Figura 7: Ejemplo de PCR múltiple realizado con hongos comerciales con síntomas del manchado marrón.



4. Colonias de controles sanos analizadas por PCR múltiple para identificar bacterias del género *Pseudomonas* y la especie *Pseudomonas tolaasii*. Los resultados para los controles por medio del gel de agarosa se muestran en la Figura 8. Las muestras se clasificaron como C1 a C10.

Figura 8: Hongos sin síntomas analizados por medio de PCR Múltiple.



C. Bioensayo

En esta prueba se utilizó las colonias aisladas para inocular cubos de champiñón sin síntomas iniciales. Se tomó como resultado positivo a aquellas colonias que causaran síntomas más severos que los observados en el control negativo. Esto se hace para descartar que el oscurecimiento se deba a la oxidación normal del hongo. El siguiente cuadro indica el resultado de cada colonia a las 24 y 48 horas según el nivel del síntoma observado.

Cuadro 11: Prueba de patogenia observada a partir de champiñones sin síntomas iniciales inoculados con colonias aisladas a partir de hongos infectados.

Prueba de patogenia observada a partir de champiñones sin síntomas iniciales inoculados con colonias aisladas a partir de hongos infectados*.										
Resultado clasificado según escala de severidad										
Código de colonia	Bajo		Medio-Bajo		Medio		Medio-Alto		Alto	
	24hrs	48hrs	24hrs	48hrs	24hrs	48hrs	24hrs	48hrs	24hrs	48hrs
<i>Ps. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C-	---	+	---	---	---	---	---	---	---	---
H1	+					+				
H2	+					+				
H3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C-	+	+								
H4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H6	+	+								
C-	---	+	---	+	---	---	---	---	---	---
H7							+			+
H8							+			+
H9		+		+						
C-	---	+	---	---	---	---	---	---	---	---
H10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H1 (1:1000)			+	+						
H3 (1:1000)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C-	---	+	---	---	---	---	---	---	---	---
H1B							+			+
H8B							+			+
H4 (1:1000)					+					+
C-	---	+	---	---	---	---	---	---	---	---
H11							+			+
H12							+			+
H13							+			+

Total colonias patogénicas: 11

*La solución para inocular se preparó con una colonia en 1 ml de agua de peptona. Se midió la densidad óptica a 600nm y se obtuvo un promedio de 0.404 A con una desviación estándar de 0.02.

D. Análisis estadístico

1. Prueba Fisher's Exact. El Cuadro 12 presenta las categorías evaluadas y el número de colonias de trabajo por categoría que fueron utilizados para realizar la prueba Fisher's Exact.

Cuadro 12: Categorías de clasificación de las colonias utilizadas en PCR múltiple y bioensayo para realizar la prueba Fisher's Exact para determinar asociación entre bacterias del género *Pseudomonas* y la patogenicidad observada en el bioensayo.

	Categoría de clasificación	Número de colonias de trabajo
1	Colonias patogénicas del género <i>Pseudomonas</i> confirmadas por PCR múltiple y bioensayo	6
2	Colonias patogénicas en bioensayo no identificadas como <i>Pseudomonas</i> por PCR múltiple.	5
3	Colonias no patogénicas en bioensayo del género <i>Pseudomonas</i> identificadas por PCR múltiple (1 control + colonia H3 (1:1000))	2
4	Colonias no identificadas como <i>Pseudomonas</i> por PCR múltiple y no patogénicas en bioensayo (9 controles restantes).	15

Nota: el número de colonias hace referencia a las colonias de trabajo únicamente (utilizadas en bioensayo y PCR múltiple) y no al número total de colonias de un mismo tipo.

Cuadro 13: Cuadro de contingencia para la prueba Fisher's Exact para determinar la asociación entre colonias de trabajo del género *Pseudomonas* y la patogenicidad observada en el bioensayo.

	<i>Pseudomonas</i>	No <i>Pseudomonas</i>
Patogénicas	6	5
No Patogénicas	2	15

Nota: el número de colonias hace referencia a las colonias de trabajo únicamente (utilizadas en bioensayo y PCR múltiple) y no al número total de colonias de un mismo tipo. Calculador en línea: Fisher's Exact Test (Langsrud, 2004).

Prueba Fisher's Exact: valor p (2 colas) = 0.0298950

Se acepta la hipótesis de trabajo si el valor-p para dos colas es menor a 0.05, de lo contrario ésta se rechaza. En cada cuadrante del cuadro de contingencia se coloca uno de los parámetros mencionados en el Cuadro 12.

De acuerdo al valor-p obtenido se decide aceptar hipótesis de trabajo, la cual se define de la siguiente manera: "Las bacterias del género *Pseudomonas* están asociadas a los síntomas de manchado marrón en el champiñón, *Agaricus bisporus*, cultivado en una granja del departamento de Guatemala".

2. Proporciones binomiales. Conociendo la morfología y comportamiento en las pruebas bioquímicas de las colonias de trabajo, y que a la vez su identidad presuntiva se confirmó con el PCR múltiple, se utilizó sus características morfológicas para identificar colonias idénticas en los aislados de los hongos obtenidos (15 aislados en total: 5 hongos individuales y 50 pools de 5 hongos).

Se describe como colonias de *Pseudomonas tolaasii* a todas aquellas que presenten la morfología siguiente: diámetro de ~2-3 mm, forma circular, margen entero, color amarilla-blanca opaca, elevada, con difusión de pigmento amarillo/anaranjado no fluorescente en agar *Pseudomonas* CFC y textura mucoide.

Se clasifica como *Pseudomonas* spp. patogénicas a aquellas colonias que presenten la siguiente morfología: diámetro de ~3 mm, forma circular, margen entero, de color amarilla-blanca opaca, elevada, con difusión de pigmento amarillo-anaranjado levemente fluorescente en agar *Pseudomonas* CFC y textura mucoide. También se encuentran dentro de esta clasificación a las colonias que: tienen un diámetro de ~3mm, forma circular, margen ondulado, de color blanca-amarilla opaca, elevada, difusión de pigmento amarillo levemente fluorescente en agar *Pseudomonas* CFC, y textura mucoide.

Se clasifica como "bacterias patogénicas no pertenecientes al género *Pseudomonas*" a aquellas que presentan la siguiente morfología: diámetro ~4-5mm, forma circular, margen entero, de color rosada brillante, elevada, sin difusión de pigmento en agar *Pseudomonas* CFC, con textura húmeda y aroma ácido.

Se clasifica como "otras colonias aisladas" a todas aquellas que presentan morfología distinta a cualquiera de las mencionadas anteriormente. No es posible clasificar a colonias que compartan la morfología de las colonias H1, H2, y H7 como "bacterias patogénicas no pertenecientes al género *Pseudomonas*" debido a que hay otras colonias de trabajo que comparten estas características y no presentan el mismo comportamiento patogénico. Sin embargo, es necesario tomar éstas en cuenta como posibles patógenos no identificados.

A continuación se presenta el cuadro con el número de hongos infectados que presentaron *Pseudomonas* spp. patogénicas distintas a *Pseudomonas tolaasii* o únicamente *Pseudomonas tolaasii* y su proporción correspondiente. Esto se realizó para determinar la proporción de dichas bacterias presentes en las muestras analizadas. Para esto se tomó en cuenta un valor total de muestra de 15 hongos, ya que 5 fueron analizados individualmente y 50 en "pools" de 5 hongos (10 muestras). La proporción y los intervalos de confianza se calcularon con un nivel de confianza de 95% ($z=1.96$).

Cuadro 14: Número de hongos o "pools" de hongos con presencia de colonias clasificadas como *Pseudomonas* spp. patogénicas, *Pseudomonas tolaasii*, o bacterias patogénicas no *Pseudomonas* spp. El resultado se presenta como una proporción binomial y su intervalo de confianza.

Número de hongos o "pools" de hongos infectados con presencia de colonias clasificadas como *Pseudomonas* patogénicas, *Pseudomonas tolaasii*, o colonias patogénicas no *Pseudomonas* spp. en la muestra total (n=15).

	Presencia de <i>Pseudomonas tolaasii</i>	Presencia de <i>Pseudomonas</i> spp. patogénicas (<i>Ps. tolaasii</i> no incluida)	Presencia de bacterias patogénicas no <i>Pseudomonas</i> spp.	Presencia de otras colonias aisladas
Número de hongos infectados de la muestra total	13	4	2	15
Proporción binomial	0.8667	0.2667	0.133	1
	IC-95% (0.621, 0.962)	IC-95% (0.109, 0.519)	IC-95% (0.037, 0.379)	IC-95% (0.796, 1)
Total: 15 muestras				

55 hongos infectados totales. 50 analizados en "pools" de 5 hongos y 5 analizados individualmente. Nota: el número de hongos no representa únicamente a las colonias de trabajo sino también a todas aquellas colonias encontradas en los aislados iniciales que pueden ser clasificadas según su morfología dentro de cualquiera de las categorías descritas.

IV. DISCUSIÓN

Las bacterias del género *Pseudomonas* son patógenos de una gran diversidad de hospederos dentro de los cuales se encuentra el champiñón, *Agaricus bisporus*. En este estudio se logró determinar que las bacterias del género *Pseudomonas* sí están asociadas a los síntomas del manchado marrón en el champiñón cultivado en una granja del departamento de Guatemala. Además se identificó la presencia de *Pseudomonas tolaasii* en los champiñones analizados, utilizando la técnica de PCR múltiple. Es importante mencionar que se trabajó con una muestra total de 65 hongos, de los cuales 10 se encontraban sanos y fueron utilizados como controles negativos; 5 de los infectados fueron trabajados individualmente bajo el método A para aislamiento y 50 fueron trabajados en "pools" de 5 hongos bajo el método B para aislamiento (ver metodología). Una de las principales limitantes del estudio fue la dificultad para contactar a más de un proveedor de muestras. Esto se debe a que de las distintas empresas dedicadas a esto, únicamente uno de ellos estuvo de acuerdo en proveer las muestras y en dar a conocer la ubicación de su granja para llegar a recogerlas.

Otra limitante importante es que no fue posible entrar al sitio donde se cultivan los hongos y seleccionar directamente del cultivo una muestra aleatoria y probabilística debido a políticas del proveedor. Sin embargo, el proveedor seleccionó los hongos siguiendo los criterios de inclusión (síntomas del manchado marrón).

A. Identificación de bacterias del género *Pseudomonas* a partir de hongos con síntomas del manchado marrón.

La identificación de bacterias del género *Pseudomonas* a partir de hongos con sintomatología del manchado marrón se llevó a cabo iniciando con el aislamiento de bacterias presentes en hongos infectados. Todos los hongos utilizados, a excepción de los controles, mostraron síntomas desde un nivel bajo hasta un nivel alto (según la escala de severidad planteada; ver metodología). Para poder cultivarlas y evitar crecimiento de bacterias no deseadas, se utilizó el agar *Pseudomonas* CFC. Este es una modificación del medio King A, que facilita el incremento en la producción de pigmentos. Además, se combina con un suplemento de cetrimida (10 mg/ml), cephaloridina (50 µg/ml) y fuccidina (10 µg/ml) para facilitar el crecimiento de *Pseudomonas* spp. e inhibir el crecimiento de bacterias Gram positivas y algunas

Gram negativas. Sin embargo, es posible que algunas colonias del género *Aeromonas*, *Shewanella*, *Erwinia* y algunas Enterobacterias puedan crecer en el agar, dependiendo de la muestra procesada (Tryfinopoulou *et al*, 2001).

El aislamiento inicial en cada caso analizado presentó crecimiento de dos colonias distintas. Una de éstas con morfología circular de ~2 a 3 mm con bordes enteros, de color amarilla/blanca opaca, elevada, de textura húmeda y no mucoide (ver Cuadro 7, colonias H2 (1:1000) y C1-C10, pp. 35). Estas colonias presentaron las mismas características bioquímicas, siendo bacilos cortos Gram negativos, no móviles, oxidasa y fluorescencia negativos, además de un resultado negativo en el bioensayo. Todas estas características sugieren que las colonias no pertenecen al género *Pseudomonas*.

La segunda colonia encontrada en todos los casos analizados presentó una morfología circular de <1-2 mm, bordes enteros, de color amarilla/blanca opaca, elevada, mucoide y con difusión de pigmento en el agar de color amarillo/anaranjado (H11-H13). Estas bacterias se describieron como bacilos cortos y gruesos Gram negativos, oxidasa positivos, móviles, con un crecimiento de color blanco-crema en medio YDC, no fermentativos de glucosa y sin fluorescencia en medio KB. Estas colonias sí mostraron un resultado positivo en el bioensayo. Estos datos sugieren que la colonia pertenece al género *Pseudomonas* y posiblemente son especies no fluorescentes. Es importante mencionar que estas colonias mostraron un comportamiento distinto luego de ser almacenadas a 4 °C por un período aproximado de 3 a 4 semanas. Al observar nuevamente las colonias, éstas mostraban una morfología mezclada con colonias irregulares, planas y secas, y se incrementó la difusión e intensidad del pigmento en el agar. Este comportamiento podría deberse a que si la bacteria aislada pertenece a la especie *Pseudomonas tolaasii* o *Pseudomonas gingeri* éstas tienen la capacidad de realizar cambios fenotípicos (switch fenotípico) en las que se encuentra dos morfologías distintas. Una de éstas (colonia tipo lisa o Smooth) se distingue por crecer de forma circular con márgenes enteros, no presenta fluorescencia, y es patógena al champiñón. La colonia rugosa (Rough) en cambio, tiene forma irregular, margen ondulado, seca, sí presenta fluorescencia en medio KB y no es patógena al champiñón (ver Figura 5) (Cutri, Macauley y Roberts, 1984) (Sinha, Pain, y Johnstone, 2000).

En algunos casos, también se encontraron colonias con morfología mezclada de forma irregular y circular, y margen entero, color blanca amarilla opaca, elevada,

mucoide, con un pigmento difuso en el agar de color amarillo-anaranjado y fluorescente en medio Pseudomonas CFC (H8, H1B, H8B). Estas colonias se identificaron como bacilos cortos y gruesos Gram negativos, móviles, oxidasa positivos, no fermentadores, con fluorescencia en medio KB, crecimiento de color blanco en medio YDC y con un resultado positivo en el bioensayo. Estas colonias probablemente pertenezcan al género *Pseudomonas* y específicamente las especies podrían ser *Pseudomonas tolaasii* o *Pseudomonas gingeri*. Cuando las colonias de dichas bacterias se encuentran en un estado de transición, se puede encontrar esta morfología mixta, con fluorescencia y patogénica al champiñón (Cutri, Macauley y Roberts, 1984) (Sinha, Pain, y Johnstone, 2000).

Además de estas colonias, es importante mencionar que se encontraron colonias rosadas con aroma ácido (H1 (1:1000) y H4 (1:1000)) con las características de ser bacilos de tamaño medio, Gram negativos, móviles, oxidasa variable, oxidativos y fermentativos en glucosa. Estos no presentaron fluorescencia en medio KB, se observó crecimiento rosa intenso en medio YDC y un resultado positivo en el bioensayo. Inicialmente se sospechó que la bacteria podría pertenecer al grupo *Erwinia* pero se descartó la posibilidad de la especie *E. carotovora* debido a un resultado negativo en la pudrición de la papa. Los resultados de esta colonia no son concluyentes para poder sugerir algún género específico.

B. Optimización de PCR múltiple para detección de bacterias del género *Pseudomonas* y especie *Pseudomonas tolaasii*.

Para poder confirmar los resultados presuntivos de las pruebas bioquímicas aplicadas a las distintas colonias se llevó a cabo la optimización del PCR-múltiple. Para esto se utilizó el kit QIAGEN Multiplex PCR (no. en catálogo: 206143). Se seleccionaron los cebadores a partir de una revisión exhaustiva de literatura y se formó dos grupos o "Primer mix" (ver metodología, Cuadro 2). Cada grupo contenía un par de cebadores generales para la detección de una región conservada del género *Pseudomonas*; un par para la detección de producción de tolaasina por *Pseudomonas tolaasii* y un par para detectar una región específica en *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* (este último par de cebadores se incluyó debido a que originalmente los objetivos del estudio involucraban a esta bacteria pero fueron modificados posteriormente).

Se inició el proceso de optimización determinando el porcentaje de agarosa adecuado para la electroforesis horizontal. Se tomó esta decisión debido a que un PCR inicial con un porcentaje de 2% limitó la migración del marcador molecular. El porcentaje óptimo fue de 1.5% debido a que se observó una mejor separación del marcador molecular, comparado con el 2%. El gel 1% agarosa presentó una migración de las bandas levemente más rápida que con 1.5% y se observó una mala separación de las bandas más pesadas del marcador molecular.

Posteriormente se procedió a determinar el set de cebadores adecuado (ver Figura 6). Se evaluaron las mismas muestras tanto con el set 1 como con el 2 con un volumen de ADN de 2 μ l. Al observar los resultados, se pudo determinar que el set 2 es menos confiable debido a que no amplificó los controles positivos y se observó una mayor cantidad de subproductos. Además, las muestras con indicios de ser *Pseudomonas* sí mostraron bandas claras al utilizar el set 1, mientras que no se observaron estas bandas con el set 2. Otra razón para descartar el set 2, es que el fragmento que identifica el género tiene un tamaño de 150 bp. Es posible que este migre demasiado en el gel; además ya no es comparable con el marcador molecular empleado.

Debido a que el PCR anterior a éste, mostró una gran cantidad de subproductos (smears), se decidió reducir los ciclos de 35 a 30. Luego se determinó el volumen de muestra de ADN óptimo en relación a cada set de cebadores (ver Figura 7). Se puede observar que en ambos casos, utilizando 1 μ l de ADN, uno de los controles positivos (*Ps. marginalis* para set 1 y *Ps. aeruginosa* para set 2) mostró bandas débiles en comparación a las muestras en las que se agregó 2 μ l de ADN. Esto se debe a la falta de muestra presente cuando se agregó 1 μ l. Probablemente reducir el volumen de muestra aumenta el error al pipetear ya que es más probable que no se esté tomando ADN con la pipeta. En cuanto a los subproductos, se observó una reducción de los mismos, por lo que se mantuvo la condición de 30 ciclos.

Finalmente, para aumentar la definición de las bandas se procedió a reducir la temperatura de anillamiento (annealing) de 60°C a 58°C. De nuevo, esto mostró un resultado óptimo y en mejor condición que el anterior por lo que se mantuvo la condición. Este cambio permitió una mejor definición de las bandas. Inicialmente se había seleccionado una temperatura de anillamiento de 60°C ya que el set 2 contiene un par de cebadores con TM de 64.7°C. Sin embargo, al eliminar este set del

estudio, fue necesario reducir la temperatura ya que el set 1 cuenta con cebadores cuya TM se encuentra entre 54 y 60°C (ver Cuadro 2). Las condiciones óptimas finales se presentan en el Cuadro 9. Las bandas obtenidas utilizando estos cebadores sí son comparables con los resultados observados en otros estudios en donde se utilizaban los cebadores individualmente. Los cebadores específicos para *Pseudomonas tolaasii* mostraban en la literatura una amplificación de 449 pb (Lee *et al*, 2002) y sí se obtuvo este tamaño de banda. Los cebadores generales para *Pseudomonas* mostraban una amplificación de 270 (DeVos, 1997) y también se obtuvo esta amplificación en este estudio.

1. Identificación de bacterias del género *Pseudomonas* utilizando la técnica de PCR múltiple. Este último PCR permitió identificar distintas muestras como bacterias del género *Pseudomonas*. Luego de evaluar 10 muestras identificadas como controles negativos (C1-C10) se determinó que únicamente una de éstas pertenecía al género *Pseudomonas*. Además se confirmó que las muestras H8, H1B, H8B, H3 (1:1000), H11, H12 y H13 corresponden a este género y concuerdan con las pruebas bioquímicas aplicadas. Estas muestras fueron secuenciadas por Eton Bioscience Inc, en San Diego, California. De estas secuencias, se identificó a H11, H12 y H13 como *Pseudomonas tolaasii*, debido a la amplificación del gen involucrado en la producción de la proteína tolaasina. Las muestras H8, H1B, H8B y H3 (1:1000) fueron identificadas como *Pseudomonas* spp debido a que se amplificó el gen OprI que codifica una lipoproteína mayor externa de superficie, presente en todas las bacterias del género. Las secuencias de cada una de las muestras fueron comparadas entre ellas para determinar la región homóloga. Se obtuvo una secuencia idéntica para las tres muestras identificadas como *Pseudomonas tolaasii* y una secuencia idéntica para las muestras identificadas como *Pseudomonas* spp. Esto se realizó utilizando el programa Chromatogram Explorer v3.0.0, de HeracleSoftware (ver secuencia y BLAST en anexo B). Las secuencias obtenidas en este estudio se relacionan directamente con las encontradas en GENE BANK. La secuencia obtenida para *Pseudomonas* spp. muestra una similitud entre 94% y 97% dependiendo de la especie con la que se compare (ver anexo B). La secuencia obtenida para *Pseudomonas tolaasii* muestra una similitud de 99% con la encontrada al realizar BLAST (ver anexo B). Estos resultados indican que las secuencias obtenidas sí son confiables y se encuentran en un rango de similitud (y podría decirse confiabilidad) del 94% para *Pseudomonas* spp. y del 99% para *Pseudomonas tolaasii*. Además, esto da confiabilidad a la técnica optimizada ya que

sí cumple su objetivo de identificar esta bacteria específica y otras patogénicas del género mencionado.

Luego de evaluar las colonias previamente aisladas, para determinar cuáles pueden ser identificadas como *Pseudomonas*, se procedió a simplificar la técnica para poder convertirla en una herramienta viable y rápida. De esta forma se podría implementar en los laboratorios y obtener resultados de los análisis en un mismo día, sin llevar a cabo el proceso de asilamiento de bacterias y purificación.

Para lograr esto, se utilizaron muestras comerciales (del mismo productor que entrego las muestras iniciales) que presentaran síntomas del manchado marrón. La extracción de ADN se llevó a cabo directamente del macerado de la sección afectada del champiñón, sin aislamiento previo de las bacterias a partir del hongo infectado. Los síntomas que presentaron estos hongos varían según la escala de severidad desde síntomas bajos hasta síntomas medio-altos.

Como control positivo se utilizó una de las muestras previas (H12) ya que esta fue confirmada como *Pseudomonas tolaasii* por medio de la secuenciación. De 13 hongos (A1-A13) analizados en el primer muestreo, se pudo determinar que en 11 estaba presente *Pseudomonas tolaasii* y sólo en dos se encontró *Pseudomonas* spp. En el segundo muestreo de 10 hongos (B1-B10), se determinó que las 10 muestras están infectadas con *Pseudomonas tolaasii*. Estas muestras se seleccionaron únicamente bajo la condición que mostraran síntomas bajos (nivel 1). Esto se realizó para poder tomar en cuenta la técnica como una herramienta de diagnóstico preventivo. Sin embargo, sería de gran importancia evaluar la utilidad del PCR múltiple para detectar la presencia de estas bacterias a partir del compost o sustrato en el cual se siembran los champiñones. De esta forma podría detectarse la bacteria y descartar los sustratos antes realizar la siembra y correr el riesgo de perder el cultivo entero. Con esto se lograría un control preventivo altamente efectivo, ya que se evita desde un principio la contaminación del hongo con la bacteria, en lugar de evitar la proliferación de la misma en el champiñón ya formado.

Este resultado, además de confirmar que *Pseudomonas tolaasii* está presente en los hongos afectados con la enfermedad del manchado marrón en cultivos de una granja del departamento de Guatemala, también permite considerar la implementación de la técnica como un diagnóstico, de esta bacteria específica o del género, relativamente rápido.

C. Relación entre bacterias del género *Pseudomonas* y síntomas del manchado marrón en hongos cultivados en una granja del departamento de Guatemala.

Finalmente, para relacionar los síntomas del manchado marrón a las bacterias del género *Pseudomonas* identificadas en el estudio, se procedió a realizar el bioensayo o prueba de patogenicidad. En este bioensayo, se logró determinar que las colonias identificadas como H1, H2, H7, H8, H1 (1:1000), H1B, H8B, H4 (1:1000), H11, H12 y H13 causan daño y síntomas del manchado marrón en champiñones sanos. Debido a los resultados del PCR se puede determinar que las colonias H1B, H8B, H8, H11, H12 y H13 sí pertenecen al género *Pseudomonas* y las últimas tres sí son *Pseudomonas tolaasii*. Esto concuerda con los resultados de las pruebas bioquímicas ya que las colonias identificadas como *Pseudomonas tolaasii* al ser patógenas deben encontrarse en su estado de colonia lisa (smooth) y no presentan fluorescencia en el medio KB o CFC. Las colonias H8, H1B, y H8B también mostraron patogenicidad y pertenecen al género antes mencionado. Debido al comportamiento que indican las pruebas bioquímicas, así como los cambios en morfología observados, es posible que estas colonias pertenezcan a la especie *Pseudomonas gingeri*. Sin embargo, es necesario llevar a cabo la identificación específica de esta bacteria para poder afirmarlo.

Las bacterias clasificadas como H1, H2, H7 que presentan la misma morfología y comportamiento que las bacterias H3, H6, y H10, podrían ser tomadas como falsos positivos en el bioensayo debido a que estas últimas tres no muestran comportamiento patogénico y además ninguna de estas seis muestras fue identificada como *Pseudomonas* por el PCR. Sin embargo, es importante tomar en cuenta que podrían ser patógenos del champiñón, distintos del género *Pseudomonas*. Para poder concluir acerca de la identidad o los efectos de estas colonias sobre el champiñón, es necesario repetir el bioensayo para poder determinar si las colonias sí presentan patogenicidad o si ocurrió un falso positivo al momento de realizarlo.

El hecho de detectar una posible fuente de error en el bioensayo, confirma que el PCR múltiple optimizado en este estudio, es una herramienta más confiable para llevar a cabo la detección de bacterias del género *Pseudomonas* aisladas a partir de hongos con síntomas del manchado marrón. Aunque el bioensayo y el PCR múltiple

tienen objetivos distintos, la secuenciación permitió validar y corroborar los resultados del PCR. Esto ofrece la ventaja de poder confiar en los resultados del PCR múltiple y usarlos como referencia para comparar contra estos los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas y morfológicas, y poder cuestionar las inconsistencias en el bioensayo.

Por otra parte, las colonias identificadas como H1 (1:1000) y H4 (1:1000) que presentan las mismas características bioquímicas y de cultivo, también presentaron patogenicidad hacia el hongo pero no fueron identificadas como *Pseudomonas*. Esto podría indicar que se trata de otra bacteria fuera del género que podría estar afectando los cultivos de champiñón y como se demostró en las pruebas bioquímicas y morfológicas es posible que sea *Erwinia* sp. Sin embargo, es necesario llevar a cabo la identificación posterior de la bacteria para poder afirmar esto. También es necesario recalcar a los productores de hongos la importancia de las buenas prácticas de higiene y sanidad, y manufactura para reducir casos de contaminaciones cruzadas que podrían involucrar nuevos patógenos constantemente al cultivo de champiñón. Esto podría tener consecuencias no solo en nuevos daños en el hongo sino también al involucrar patógenos para el humano que podrían ser transmitidas a través del champiñón como fuente de alimento.

De cualquier forma, la presencia de estas bacterias no identificadas en el champiñón indica que existe un patógeno que está afectando al cultivo y podría, eventualmente, ser tan dañino como las bacterias del género *Pseudomonas*. Aunque se observó con las proporciones binomiales que éstos patógenos no identificados se encuentran en una muy baja proporción comparado con las del género *Pseudomonas*, es importante llevar a cabo su identificación y comprobación de la patogenicidad al champiñón, ya que podría tratarse de un nuevo agente causal del manchado marrón en este hongo.

Por último, se encontró una bacteria previamente identificada como *Pseudomonas* spp. que no causó daño al inocularla en el champiñón sano. Analizando los resultados de pruebas bioquímicas, es probable que esta bacteria se trate de una *Pseudomonas fluorescens* ya que muestra fuerte fluorescencia y no es patógena al champiñón.

Para poder concluir que los síntomas observados en el bioensayo tienen relación con las colonias inoculadas y previamente identificadas como *Pseudomonas*, se

aplicó la prueba de Fisher's exact test para cuadros de contingencia (ver Cuadro 11 y 12). En esta prueba se evaluó la cantidad de bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* que causan patogenicidad en el champiñón contra, otras bacterias patogénicas, bacterias no patogénicas pertenecientes al género y bacterias no patogénicas distintas a *Pseudomonas*. Para realizar esta prueba también se tomaron en cuenta los falsos positivos como bacterias no patogénicas y distintas al género. Al obtener un valor p (2 colas) de 0.029, se puede determinar que éste es menor a 0.05 (equivalente a 95% de confianza) por lo que es posible aceptar la hipótesis de trabajo.

De igual manera, se determinó la proporción binomial con intervalos de confianza del 95% para evaluar la proporción de las distintas bacterias presentes en la muestra analizada. Esta muestra se consideró como 15 muestras totales, ya que inicialmente se evaluaron a 5 hongos individuales y luego se procesaron 50 hongos agrupados en "pools" de 5 hongos, lo que forma un total de 15 muestras finales. En estas proporciones no se evaluaron los controles negativos ya que se deseaba determinar la presencia de bacterias patogénicas en hongos con síntomas. La proporción de *Pseudomonas tolaasii* fue la mayor, con un valor de 0.8667 IC-95% (0.621 - 0.963). La proporción de bacterias patogénicas del género *Pseudomonas* tuvo un valor de 0.2667 IC-95% (0.109-0.519) y las bacterias patogénicas que no pertenecen a este género están presentes en una proporción de 0.1333 IC-95% (0.037-0.379). Estas proporciones indican que en este estudio *Pseudomonas tolaasii* se encuentra en mayor proporción a otras bacterias patogénicas en los hongos con síntomas del manchado marrón, por lo que podría considerarse que es la principal causa de estos síntomas.

De esta forma es posible decir que el estudio logró exitosamente identificar que las bacterias del género *Pseudomonas* sí están asociadas a los síntomas del manchado marrón en el champiñón, *Agaricus bisporus*, cultivado en una granja del departamento de Guatemala.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

A. Conclusiones

1. De acuerdo a los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas, el PCR múltiple y el bioensayo, se pudo concluir que las bacterias del género *Pseudomonas* son las principales agentes infecciosas presentes en champiñones, *Agaricus bisporus*, cultivados en una granja del departamento de Guatemala.

2. De las bacterias patógenas identificadas como *Pseudomonas*, se encontró en mayor proporción que a otras a la bacteria *Pseudomonas tolaasii* (H11, H12, H13; A1-A13; B1-B10).

3. Se aislaron tres tipos distintos de colonias bacterianas causantes de la enfermedad del manchado marrón, todas pertenecientes al género *Pseudomonas*. Las pruebas y ensayos aplicados a estas muestras indican la posibilidad de que éstas pertenezcan a la especie *Pseudomonas gingeri*.

4. Se encontró una colonia (H1 (1:000) y H4 (1:1000)) que no fue identificada como *Pseudomonas* spp y causó síntomas en el champiñón inoculado en el bioensayo, por lo que es necesario realizar pruebas específicas para identificarlas.

5. Se encontraron tres colonias (H1, H2, y H7) que mostraron patogenicidad en el bioensayo, pero no fueron identificadas y comparten características bioquímicas y morfológicas con bacterias no patogénicas por lo que podrían considerarse como falsos positivos. Sin embargo es posible que correspondan a patógenos no pertenecientes al género *Pseudomonas*.

6. En cuanto al PCR múltiple, se logró determinar que las condiciones óptimas, distintas a la receta indicada en la metodología, para identificar bacterias del género *Pseudomonas* son: utilizar el set de cebadores 1 (Pt-1A, Pt-1D1, OLI-1, Y2, Ps1 y Ps2), aplicar a la mezcla (Master Mix) un total de 2 µl de ADN (<1 µg/ml o si la extracción se realiza directamente de una fuente con un conteo alto de la bacteria a analizar); programar el termociclador (marca Eppendorf modelo Mastercycler Pro S) para llevar a cabo 30 ciclos con una temperatura de anillamiento (annealing) de 58°C. Además es importante que se evalúe los productos en un gel de agarosa al 1.5% con un marcador molecular de 1 kb en donde el fragmento más pequeño sea de 250 bp o menor.

7. Las condiciones utilizadas para llevar a cabo el PCR múltiple permiten procesar muestras directamente del macerado del hongo sin llevar a cabo el aislamiento y purificación de la bacteria.

8. En el bioensayo se demostró que todas las bacterias identificadas como *Pseudomonas*, con excepción de una (H3 (1:1000)), causaron los síntomas del manchado marrón al ser inoculadas en hongos sanos.

9. Al realizar la prueba Fisher's exact test, se obtuvo un valor-p de 0.029, el cual permite aceptar la hipótesis de trabajo bajo un nivel de confianza de 95%.

B. Recomendaciones

1. Se recomienda evaluar, en estudios posteriores, la presencia de *Pseudomonas gingeri* en el champiñón cultivado en Guatemala.

2. Se recomienda evaluar la presencia de bacterias no pertenecientes al género *Pseudomonas* que también causen los síntomas del manchado marrón y en qué proporción afectan en relación a las *Pseudomonas*. Específicamente se recomienda evaluar las colonias H1 (1:1000) y H4 (1:1000) ya que sí mostraron comportamiento patogénico y no pudieron ser identificadas con exactitud.

3. Se recomienda repetir el bioensayo y llevar a cabo la identificación de las colonias H1, H2 y H7 para confirmar si los resultados de esta prueba corresponden a un falso positivo, o si las colonias son patógenos no identificados.

4. Debido a que la técnica de PCR múltiple es útil para detectar a la bacteria *Pseudomonas tolaasii* aún cuando el champiñón muestra síntomas bajos, se recomienda implementar la técnica para un diagnóstico preventivo de los cultivos.

5. Se recomienda evaluar si el PCR múltiple puede ser utilizado para analizar directamente muestras del sustrato o compost en el que se cultivan los champiñones. De ser útil, se recomienda llevar a cabo diagnósticos preventivos utilizando esta técnica, tanto del hongo como del sustrato para tener un mejor control del cultivo.

6. Ya que se conoce la presencia de *Pseudomonas tolaasii* y bacterias del género *Pseudomonas* se recomienda a los productores evaluar sus cultivos de forma periódica, en busca de bacterias patógenas del género *Pseudomonas* utilizando la técnica de PCR múltiple descrita en este estudio, para poder tomar medidas de control antes de que proliferen los síntomas del manchado marrón.

7. Se recomienda a los productores evaluar las posibles fuentes de propagación de la bacteria, así como implementar o reforzar las buenas prácticas de higiene y manufactura para evitar posibles contaminaciones del cultivo con nuevos patógenos.

8. Se recomienda a los productores realizar una revisión de los posibles tratamientos a utilizar para controlar la infección de la bacteria *Pseudomonas tolaasii*.

Existen tratamientos biológicos y químicos, pero depende del productor y sus políticas decidir cuál es el más indicado para su plantación. A continuación se presenta una lista de literatura sugerida para informarse acerca de posibles tratamientos. En el anexo C se puede ver la descripción de una de las opciones sugeridas. Se recomienda altamente revisar los incisos e y f de esta lista sugerida.

a. Tratamiento con Bronopol: W.C. Wong, y T.F. Preece. 2008. *Pseudomonas tolaasii* in mushroom crops: activity of formulation of 2-bromo-nitropropane-1,3- diol (bronopol) against the bacterium and the use of this compound to control blotch disease. London. Journal of Applied Bacteriology. 58(1): 275-281.

b. Tratamiento con antibiótico kasugamycin: F.P. Geels. 2008. *Pseudomonas tolaasii* control by kasugamycin in cultivated mushrooms (*Agaricus bisporus*). Netherlands. Journal of Applied Microbiology. 79(1):38-42.

c. Control biológico con otras bacterias: N.G. Nair y P.C. Fahy. 2008. Bacteria antagonistic to *Pseudomonas tolaasii* and their control of brown blotch of cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. Sydney, Au. Journal of Applied Microbiology 35(3):439-442.

d. Control integrado: Y. Bashan y Y. Okon. 1981. Integrated control of bacterial blotch in Israel. Mushroom Journal. 97:29-33.

e. Pesticidas sugeridos disponibles para la producción de hongos *Agaricus*: Beyer, D. y Payley K. 2009. Pesticidas disponibles para la producción de hongos *Agaricus* en los Estados Unidos. Pennsylvania, USA. <<http://mushgrowinfo.cas.psu.edu/pesticides%20for%20Agaricus%20in%20Spanish%202010.htm>> [Consultado: 13/05/2010]

f. Tratamiento con cloro 150 ppm: Wuest, P. 2002. Manejo integral de plagas del champiñón. Pennsylvania, USA. <<http://mushgrowinfo.cas.psu.edu/Manejo%20Integral%20de%20Plagas%20del%20Champinon%20Manual.pdf>> [Consultado: 13/05/2010]

VI. LITERATURA CITADA

- Agrizak, C.A. 2008. *Enfermedades, plagas y control en el cultivo del champiñón*. Venezuela. <<http://agrizak.setamed.com/enfecont/enfe.htm>> [Consultada: 20/10/2008]
- Barbado, J. L. 2003. *Hongos comestibles: su empresa de fungicultura*. 1ª Edición. Editorial Albatros. Buenos Aires. Pp. 47-78.
- Bessett, A. E. 1984. Distribution of brown blotch bacteria in wild and cultivated species of basidiomycetes. Universidad de Maine. *Applied and Environmental Microbiology* 48(4):878-880.
- Boa, E. 2004. *Wild edible fungi: A global overview of their use and importance to people*. FAO Corporate Document Repository. <<http://www.fao.org/docrep/007/y5489e/y5489e00.htm#TopOfPage>> [Consultado: 18/10/2008]
- Chang, S-T, J. Buswell y P. Miles. 1992. Genetics and breeding of edible mushrooms. *CRC Press*. Hong Kong. Pp.4-10, 51-60.
- Chang, S-T y P. Miles. 2004. *Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect and environmental impact*. 2ª Edición. CRC Press. Hong Kong. Pp. 3, 8, 45-50, 200-220, 370-378.
- Chavarro, E y J. Díaz. 2006. Establecimiento de un sistema diagnóstico para la detección de *Ralstonia solanacearum* y diferenciación genética utilizando marcadores moleculares RAPD. *Revista Colombiana de Biotecnología* 7(1):14-31.

- Crown, J. 2006. *Pseudomonas and mushrooms*. Department of Agriculture and Rural Development. London. UK.
<http://www.ruralni.gov.uk/print/index/crops/mushrooms/mushrooms_techinfo/techinfo_mushindx/pseudomonas.htm> [Consultado: 04/02/2010]
- Cutri, S; B.J. Macauley y W.P. Roberts. 1984. Characteristics of pathogenic non-fluorescent (smooth) and non-pathogenic fluorescent (rough) forms of *Pseudomonas tolaasii* and *Pseudomonas gingeri*. Department of Microbiology, Sydney, Australia. *Journal of Applied Microbiology* 57(1): 291-298.
- De León, R. 2003. Cultivation of edible and medicinal mushrooms in Guatemala, Central America. *Microbiología Aplicada Internacional*. 15(01):31-35.
- DeVos, D; A. Lim; J.P. Pirnay; M. Struelens; C. Vandenvelde; L. Duinslaeger; A. Vanderkelen y P. Cornelis. 1997. Direct detection and identification of *Pseudomonas aeuriginosa* in clinical samples such as skin biopsy specimens and expectorations by multiplex PCR based on two outer membrane lipoprotein genes, oprI and oprL. Brussels, Belgium. American Society of Microbiology. *Journal of Clinical Microbiology* 35(6):1295-1299.
- Euzeby, J.P. y Kudo, T. 2001. Corrigenda to the Validation Lists. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51:1933-1938.
- Gerald, M; J. R. Gorny y A. E. Yousef. 2006. *Microbiology of fruits and vegetables*. Taylor and Francis Group, CRC Press, Florida. Pp. 134-140.
- Godfrey, S. A. C.; S. A. Harrow, J. W. Marshall, J. D. Klena. 2001. Characterization by 16S rRNA sequence analysis of *Pseudomonas* causing blotch disease of cultivated *Agaricus bisporus*. Universidad de Canterbury. *Applied and Environmental Microbiology*.
<<http://aem.asm.org/cgi/reprint/67/9/4316>> [Consultada: 15/10/2008]

- Hawksworth, D. 2001. *Ainsworth & Bisby's, dictionary of the fungi*. 9th ed. CABI Publisher International. London. Pp. 310 y 616.
- Hu J. B; X. Deslandes L. Hirsch y J. Feng. 2008. Transcriptional responses of *arabidopsis thaliana* during wilt disease caused by the soil-borne phytopathogenic bacterium, *Ralstonia solanacearum*. *PLoS ONE* 3(7): e2589 1-10.
- Kelsey, E. 2009. Sample size calculation for unmatched case-control studies. OpenEPI. Version 3.03.17 methods in observational epidemiology. 2nd Edition. Table 12-15. <<http://www.sph.emory.edu/~cdckms/sample%20size%20%20grps%20case%20control.html>> [Consultada: 10/04/2010]
- K-H. Cho; S.Tae Kim y Y. Kee Kim. 2006. Purification of a pore-forming peptide toxin, Tolaasin, produced by *Pseudomonas tolaasii* 6264. Chungbuk National University, Seoul. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 40(1):113-118.
- Langsrud, O. 2004. Fisher's Exact Test (Online Calculator). Amsterdam. <<http://www.langsrud.com/stat/fisher.htm>> [Consultado: 03/05/2010]
- Lee, H.I.; K.S. Jeong; J.S. Cha. 2002. PCR assays for specific and sensitive detection of *Pseudomonas tolaasii*, the cause of brown blotch disease of mushrooms. *Letters in Applied Microbiology*. Florida. 35(4): 276-280.
- Lowry, R. 2010. *Concepts and applications of inferential statistics: Fisher's Exact Probability Test*. Vassar Stats: Website for Statistical Computation. New York. <<http://faculty.vassar.edu/lowry/webtext.html>> [Consultado: 12/04/2010]
- Lowy, B. 1975. Notes on mushrooms and religion. Hollywood, California. *Revista Interamerica Review* 5(1):110-118.

- Méndez, S. y E. Pérez-Roth. 2003. La PCR Múltiple en microbiología clínica. Madrid. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 22(1):183-192.
- Morales, O; M. Bran; R. Cáceres y R. Flores. 2002. Contribución al conocimiento de hongos comestibles en Guatemala. Universidad San Carlos de Guatemala. <<http://www.hongoscomestibles-latinoamerica.com/P/P/30.pdf>> [Consultado: 25/09/2008]
- Morales, O; R. Arzú. 2007. Caracterización *in vitro* y producción de cuerpos fructíferos de cepas nativas de *Neolentinus ponderosus* y *N. lepideus*. Universidad San Carlos de Guatemala. <http://digi.usac.edu.gt/programas/proyectos/2007/index_archivos/archivos/puidi/cepas.pdf> [Consultado: 25/09/2008]
- Morcillo, M. y M. Sánchez. 2005. Cultivo de setas y desarrollo rural en Nicaragua. *Micología Forestal y Aplicada*. Barcelona. <http://www.micofora.com/PDF/articulos_6.pdf> [Consultado: 25/09/2008]
- Munsch, P.; V. A. Geoffroy; T. Alatossava y J.M. Meyer. 2000. Application of siderotyping for characterization of *Pseudomonas tolaasii* and *Pseudomonas reactans* isolates associated with brown blotch disease of cultivated mushrooms. Oulu. *Applied and Environmental Microbiology* 66(11):4834-4841.
- Nair, N.G y P.C. Fahy. 1972. Bacteria antagonistic to *Pseudomonas tolaasii* and their control of brown blotch of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. New York. *Journal of Applied Bacteriology* 35(3):439-442.
- Paine, S.G. 1919. Studies in bacteriosis II: A brown blotch disease of cultivated mushrooms. *Annals of Applied Biology* 1(5):206-219

- Purohit, HJ; D.V. Raje y A. Kapley. 2003. Identification of signature and primers specific to genus *Pseudomonas* using mismatched patterns of 16S rDNA sequences. Nagpur. *BCM Bioinformatics*. 4(19):1-9.
- Roche, D. 2008. Caracterización de la biodiversidad de cepas presuntivas de *Bacillus thuringiensis* en distintos nichos de la filoesfera del árbol del aguacate en Guatemala, Sacatepéquez y Alta Verapaz. Departamento de Bioquímica y Microbiología. Tesis para optar al grado de Licenciada en Bioquímica y Microbiología. Guatemala. Pp. 49, 56-59.
- Rodríguez, D. 2007. Determinación de biovares y razas de *Ralstonia solanacearum* E.F.Smith, asociados a la marchitez bacteriana, en los cultivos de tomate *Solanum lycopersicon* L. y chile pimiento *Capsicum annuum* L. en el oriente de Guatemala. Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala. Tesis para optar por el grado de Ingeniera Agrónoma. Guatemala. Pp. 54.
- Sinha, H; A. Pain y K. Johnstone. 2000. Analysis of the role of *recA* in the phenotypic switching of *Pseudomonas tolaasii*. Department of Plant Sciences. Cambridge. *Journal of Bacteriology* 182(22):6532-6535.
- Tryfinopoulou, P; E.H. Drosinos y G. J. E. Nychas. 2001. Performance of *Pseudomonas* CFC-selective medium in fish storage ecosystems. Department of food science and technology. Athens. *Journal of Microbiological Methods* 47(2001):243-247.
- Volk, T.y K. Ivors. 2001. *Tom Volk's fungus of the month of April 2001: Agaricus bisporus*. California. <http://botit.botany.wisc.edu/toms_fungi/apr2001.html> [Consulta: 22/09/08].

VII. ANEXOS

A. Lista de reactivos

1. Reactivos principales:

a. Agua peptonada

Preparación: disolver 2.55 g de agua peptonada en 100 mL de agua destilada estéril.

b. Agar selectivo *Pseudomonas* CFC (OXOID).

Preparación: disolver 24.2 g de agar selectivo *Pseudomonas* CFC en 500 mL de agua destilada. Agregar 5 mL de glicerol 20% y esterilizar. Al finalizar la esterilización, esperar a que el medio alcance una temperatura de 50 °C aproximadamente y agregar 1 vial de suplemento CFC (Oxoid).

c. Buffer TE (10 mM Tris, pH 7.5; 1 mM EDTA).

d. Kit para extracción de ADN: QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN).

e. Kit para PCR Multiplex: QIAGEN Multiplex PCR Kit (QIAGEN).

B. Secuencias obtenidas a partir de colonias analizadas.

1. Secuencia del fragmento amplificado para detectar bacterias del género *Pseudomonas*.

>Contig-2010-03-25AB_148237-GeneratedwithDNABaser
 GGCTACCGTTGCAGCAGCGTCTCCAAAGAAACCGAAGCTTCGTCTGACTGCTACTG
 AAGACGCAGCAGCTCGCTCCCAAGCTCGTGACGACGAAGCCTACCGTAAAGCTGAT
 GAAGCTCTGGCTGCTGCTCAAAAAGCTCAACAGACTGCTGACGAAGCTAACGAGCG
 CGCTCTGCGTATGCTGGAAAAAGCCAGCCGCAAGACTT

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AF065980.1	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> LMG 1245 major outer membrane lipoprotein I (opr)	337	337	97%	2e-89	97%
AF065975.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC 17400 major outer membrane lipoprotein I (opr)	337	337	97%	2e-89	97%
AF065974.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Flur 18 major outer membrane lipoprotein I (opr)	337	337	97%	2e-89	97%
CP000076.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5, complete genome	331	331	97%	8e-88	96%
AF065981.1	<i>Pseudomonas marginalis</i> LMG 2214 major outer membrane lipoprotein I (opr)	331	331	97%	8e-88	96%
AF065979.1	<i>Pseudomonas tolaasii</i> LMG 2342 major outer membrane lipoprotein I (opr)	331	331	97%	8e-88	96%
AF065978.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i> LMG 5833 major outer membrane lipoprotein I (opr)	331	331	97%	8e-88	96%
AF065976.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i> LMG 5938 major outer membrane lipoprotein I (opr)	331	331	97%	8e-88	96%
AF065973.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Flur 13 major outer membrane lipoprotein I (opr)	331	331	97%	8e-88	96%
AF065972.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Flur 11,17 major outer membrane lipoprotein I (opr)	331	331	97%	8e-88	96%
AF065971.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i> LMG 5939 major outer membrane lipoprotein I (opr)	326	326	97%	4e-86	96%
AF065977.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i> LMG 1244 major outer membrane lipoprotein I (opr)	320	320	97%	2e-84	95%
CP000094.2	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf0-1, complete genome	315	315	97%	8e-83	95%

2. Secuencia del fragmento amplificado para detectar *Pseudomonas tolaasii*.

> Contig - 2010-04-06BA_149924 - Generated with DNA Baser
 CCTTAGCGCTGATTGGCGCGCTGGTGGGCGAGATCATCGCGCCAACCGT
 GGGCTGGGCTATTTGCTCTCGGACGCGGCCTCGAGTTGACACTGCCGGC
 GTGTTGCTCGCTGCTGGTGGGCATCATTGCCCTGGCGCTGATCCTCAACACCG
 CCGTGAAGCTCGCCGAACGCAAGCTGATGCCGTGGAAAGCCAACGAAGCC
 GAACGTGAAGTCGCGGTTTAAACCCCTCTATTGCTGGAGTTTGATCATGCTTA
 AGCGTCTCGTGATTGCCGGTCTGTTGTGCGCCTCGTTTTTACCCGCCGACA
 GGCTCAGGATCTGACCAAAGTGACCCTCGCATTCCCAGCGAAGGTTTCCTG
 TATGTGCCGATTATGTGGCGCAGAAGCAGGTTTACTTTGATCAGATCCTGAG
 CCTGTGCGGCGGGTAAAAACGAGGCGCACAACAGACCGGCAATCACGAGA
 CGCTTAAGCATGATCAAACCTCCAGCAATAGAGGGGGTTAAACCGCGACTTCA
 CGTTCGCTTCGTTGGCTTCCACGGCATCAGCTTGCGTTCCGGCGAGCTTCA
 CGGCGGTGTTGAGGATCAGCGCCAGGGCAATGATGCCACCAGCGAGGGCG
 AACACGCCGGCAGTGTGCAACTGCGAGGCCGCGTCCGAGAGCATGTAGCCC
 AGCCACGGTAGGGCGCCATGATCGCGAGCTGGCGCGCGCTGAGGGCTGG
 CGTACTCTGTGCTGCAGACAAGGATTCTTGGCGGCGGGCCGCCGAACATCCT
 GCCAGGTCGCGTCCAGATTGGCTATCACGAGGCATTTCCACCCGCATCA
 TGGGCGTGCCGATGTGATTTTTAGTCCCGAGCC

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AF291753.1	<i>Pseudomonas tolaasii</i> tolaasin biosynthesis gene sequence	736	1254	80%	0.0	99%
EF061509.1	<i>Pseudomonas tolaasii</i> strain K59 genomic sequence	492	827	80%	2e-135	89%

C. Método de control correctivo/preventivo contra el manchado marrón causado por *Pseudomonas tolaasii*. (revisar literatura citada en lista de literatura recomendada para el control de la enfermedad, ver recomendaciones).

1. Como concepto principal de la enfermedad se debe tener en mente que generalmente la bacteria se encuentra presente en el compost y únicamente induce los síntomas cuando aumenta la humedad (principalmente en el sombrero del champiñón) en el ambiente. Generalmente puede encontrarse 50 millones de bacterias por sombrero en un hongo sin síntomas o con síntomas bajos, y este aumenta a 200 millones en un hongo con síntomas medios a severos (Wuest, P. 2002).

Uno de los controles más utilizados (y por esto el recomendado) es la aplicación de cloro (hipoclorito de sodio) en el agua utilizada para la irrigación del cultivo. Este se debe agregar al agua en una concentración de 150 ppm y utilizando agua potable para irrigar. Se recomienda irrigar con un esparcidor (atomizador) a una altura constante sobre el cultivo para evitar la acumulación de la solución en un área y lograr un regado más homogéneo (Wuest, P. 2002).

Sin embargo, debido a que la bacteria tiene un desarrollo relativamente rápido en el hongo cuando este se encuentra húmedo (50 millones a 200 millones en menos de 2 horas), es importante realizar un ciclo de secado. Esto puede lograrse aumentando la temperatura del ambiente (si es controlable) entre 2 – 5°C y la humedad reducida a menos de 85%. El objetivo es reducir la humedad en el cuarto de cultivo para lograr secar el sombrero del hongo. Es de alta importancia llevar a cabo el ciclo de secado del hongo, ya que sin este, la bacteria prolifera y la aplicación de cloro se vuelve inefectiva (Royse y West, 1980) (Wuest, P. 2002).

Si el método presentado falla en el control, se recomienda revisar métodos relativamente más complejos como el tratamiento con Bronopol (Wongo y Preece, 2008) o el uso de agentes biológicos o pesticidas (Beyer y Payley, 2009).