



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN  
NICOLAS DE HIDALGO**



**Facultad de Químico Farmacobiología**

**“IDENTIFICACION DE FITOPATOGENOS FUNGICOS POR TÉCNICAS  
MOLECULARES EN CULTIVOS DE FRUTILLAS ROJAS EN LA REGIÓN DE  
LOS REYES MICHOACÁN.”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**Química Farmacobióloga**

**PRESENTA:**

**Erika Nayeli Villegas Moreno**

**ASESOR:**

**Dr. Rafael Ortiz Alvarado**

TESIS APOYADA POR EL CONSEJO ESTATAL DE CIENCIA, TECNOLOGÍA E INNOVACIÓN DEL ESTADO  
MICHOACÁN.

**Morelia, Michoacán, Abril del 2013**

El presente trabajo de investigación se realizo en el LAACA (Laboratorio De Análisis De Aseguramiento De La Calidad Del Agua) de la Facultad de Químico Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la asesoría del **Dr. Rafael Ortiz Alvarado**, el Instituto Tecnológico Superior de Los Reyes a través del departamento de Innovación Agrícola que permitió la incorporación de herramientas de geoposicionamiento bajo la dirección del Ing. Omar Jesús López Neri y apoyado por el Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología e Innovación del Gobierno del Estado de Michoacán.

## Dedicatoria / Agradecimientos

Dedicar esta tesis me hace recordar todos aquellos momentos que pase para su realización, es como activar una película en donde se ven todos los instantes que pase desde que la inicie hasta su culminación. Dentro de esta película están varios personajes que significaron mucho para mí, los cuales fueron pilares fundamentales en el desarrollo de mi tesis y de toda mi carrera universitaria.

A Dios

Por qué cada paso que doy siempre estás tú, por haberme permitido llegar hasta este punto y ser el pilar más importante que me ha impulsado para concluir este proyecto.

A mis padres

GRACIAS por todo papa y mama por darme una carrera para mi futuro y por creer en mí, Por haberme apoyado en todo momento, por la motivación, el coraje y el impulso que han sido en mi ejemplo, para lograr mis objetivos.

A mis hermanos y amigos

Por estar siempre conmigo a lo largo de mi carrera en las buenas y en las no tan buenas, gracias hermana por impulsarme y siempre tener un buen consejo para mí, los quiero.

Finalmente a los maestros

Aquellos que marcaron cada etapa de mi camino universitario, y que me ayudaron en asesorías y dudas presentadas en la elaboración de la tesis. En especial al Dr. Rafael Ortiz Alvarado por su tiempo, gran apoyo y motivación para la culminación de mis estudios profesionales y para la elaboración de esta tesis.

## Contenido

<b>PORTADA</b> .....	<b>I</b>
<b>DEDICATORIA / AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>III</b>
<b>INDICE DE CONTENIDO</b> .....	<b>IV</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>VI</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>VII</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>VIII</b>
<b>I RESUMEN</b> .....	<b>XI</b>
<b>II. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2.1 DESCRIPCIÓN DE LA ZARZAMORA</b> .....	<b>1</b>
2.1.1 <i>Taxonomía</i> .....	<b>2</b>
<b>2.2 VARIEDAD DE ZARZAMORA</b> .....	<b>2</b>
<b>2.3 IMPORTANCIA ECONÓMICA</b> .....	<b>2</b>
<b>III. ANTECEDENTES</b> .....	<b>4</b>
<b>3.1 HONGOS FITOPATÓGENOS</b> .....	<b>4</b>
<b>3.2 RIESGOS FITOPATOLÓGICOS:</b> .....	<b>4</b>
<b>3.3 ORGANISMOS CAUSALES</b> .....	<b>5</b>
3.3.1 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .....	<b>5</b>
3.3.2 <i>Colletotrichum coccodes</i> .....	<b>7</b>
3.3.2.1 Información de interés clínico: .....	<b>7</b>
3.3.3 <i>Fusarium oxysporum</i> :.....	<b>9</b>
3.3.3.1 Aspecto de la colonia .....	<b>9</b>
3.3.3.2 Aspecto microscópico .....	<b>9</b>
3.3.3.3 Información de interés clínico .....	<b>9</b>
<b>3.4 LOS SÍNTOMAS</b> .....	<b>11</b>
<b>3.5 CICLO DE LA ENFERMEDAD Y EPIDEMIOLOGÍA:</b> .....	<b>11</b>
<b>3.6 TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR</b> .....	<b>15</b>
<b>3.7 TÉCNICAS DE MUESTREO</b> .....	<b>15</b>
<b>IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	<b>17</b>
<b>V. JUSTIFICACIÓN DE LA PROPUESTA</b> .....	<b>18</b>
<b>VI. HIPÓTESIS</b> .....	<b>19</b>
<b>VII. OBJETIVOS</b> .....	<b>20</b>
<b>7.1 OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>20</b>
<b>7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>20</b>
<b>VIII. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>21</b>
<b>8.1 MEDIOS DE CULTIVO</b> .....	<b>21</b>
8.1.1 <i>Agar papa dextrosa (APD) J.T. Baker</i> .....	<b>21</b>
8.1.2 <i>Agar nutritivo estándar J.T. Baker</i> .....	<b>23</b>
8.1.3 <i>Agar (sólido/líquido) YPG SIGMA- ALDRICH</i> .....	<b>25</b>
<b>8.2. REACTIVOS</b> .....	<b>27</b>
8.2.1 <i>Triton X-100 SIGMA- ALDRICH</i> .....	<b>27</b>
8.2.2 <i>Buffer TAE 50X</i> .....	<b>28</b>
8.2.3 <i>Gel de agarosa</i> .....	<b>29</b>
<b>8.3 EQUIPO</b> .....	<b>31</b>
<b>8.3.1. SISTEMA PORTÁTIL DE GEOPOSICIONAMIENTO GLOBAL (GPS)</b> .....	<b>31</b>
<b>8.4. AISLAMIENTO Y GEOPOSICIONAMIENTO DE HONGOS FITOPATÓGENOS</b> .....	<b>33</b>

8.5 EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS .....	33
8.6. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	35
8.7 AMPLIFICACIÓN MEDIADA POR LA TAQ POLIMERASA (PCR) .....	38
8.7.1. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA. ....	38
8.8 ELECTROFORESIS .....	38
<b>IX. RESULTADOS. ....</b>	<b>39</b>
9.1 UBICACIÓN GEOGRÁFICA .....	39
9.2 TOMA DE MUESTRA .....	41
9.3 PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA.....	41
9.4 IDENTIFICACIÓN DE HONGOS FITOPATÓGENOS.....	45
9.5 CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA. ....	47
9.6 IDENTIFICACIÓN <i>COLLETOTRICHUM SP.</i> Y <i>FUSARIUM SP.</i> POR PCR.....	49
<b>X. DISCUSIÓN .....</b>	<b>53</b>
<b>XI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>55</b>
<b>XII. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>56</b>
<b>XIII. GLOSARIO .....</b>	<b>57</b>
<b>XIV. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>61</b>
14.1 SITIOS WEB CONSULTADO.....	64

## Índice De Tablas

<b>TABLA 1.</b> FORMULACIÓN APD .....	22
<b>TABLA 2.</b> FORMULACIÓN AGAR NUTRITIVO ESTÁNDAR J.T. BAKER. ....	24
<b>TABLA 3.</b> FORMULACIÓN YPG.....	26
<b>TABLA 4.</b> FORMULACIÓN BUFFER TAE 50%.....	28
<b>TABLA 5.</b> FORMULACIÓN GEL DE AGAROSA. ....	30
<b>TABLA 6.</b> DATOS DEL EQUIPO DE GEOPOSICIONAMIENTO .....	31
<b>TABLA 7.</b> RESULTADOS DEL MUESTREO POR MEDIO DEL GPS. ....	40
<b>TABLA 8.</b> CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS .....	46
<b>TABLA 9.</b> CONCENTRACIÓN OBTENIDA DE ÁCIDOS NUCLEICOS. ....	48

## Índice de Figuras

<b>FIGURA 1.</b> (A) CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA DE <i>COLLETOTRICHUM GLOEOSPORIODES</i> ; (B) IMAGEN DE CONIDIOS. (C) CULTIVO DE <i>COLLETOTRICHUM GLOEOSPORIODES</i> .....	6
<b>FIGURA 2.</b> (A) CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA DE <i>COLLETOTRICHUM COCCODES</i> ; (B). IMAGEN DE LAS CONIDIAS; (C) CULTIVO DE <i>COLLETOTRICHUM COCCODES</i> .....	8
<b>FIGURA 3.</b> (A) CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA DE <i>FUSARIUM OXYSPORUM</i> ; (B) IMAGEN DE LOS CONIDIÓFOROS Y MACROCONIDIAS EN FORMA DE MEDIA LUNA; (C) CULTIVO DE <i>FUSARIUM OXYSPORUM</i> .....	10
<b>FIGURA 4.</b> CICLO DE VIDA .....	13
<b>FIGURA 5.</b> <i>COLLETOTRICHUM GLOEOSPORIODES</i> . REPRODUCCIÓN, INFECCIÓN Y CICLO DE VIDA DE LA ENFERMEDAD .....	14
<b>FIGURA 6.</b> EQUIPO UTILIZADO PARA EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS DE NUEVA GENERACIÓN ZYMO RESEACH.....	32
<b>FIGURA 7.</b> EJEMPLIFICACIÓN PARA OBTENCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ARN <sub>M</sub> .....	36
<b>FIGURA 8.</b> (A) PROCESO DE ELECTROFORESIS (B) ENSAMBLE DE ELECTRODOS (C) GENERADOR DE CORRIENTE. ....	37
<b>FIGURA 9.</b> GEOREFERENCIA DE LOS NUEVE PUNTOS DE MUESTREO, EN LOS REYES, MICHOACÁN. ....	42
<b>FIGURA 10.</b> (A) MEDIO DE CULTIVO YPG SÓLIDO, (B) MEDIO DE CULTIVO YPG SÓLIDO INOCULADO CON EL MICROORGANISMO CAUSAL <i>COLLETOTRICHUM SP.</i> (C) MEDIO DE CULTIVO YPG SÓLIDO INOCULADO CON EL MICROORGANISMO CAUSAL <i>FUSARIUM SP.</i> (D) MEDIO DE CULTIVO YPG LÍQUIDO INOCULADO CON EL MICROORGANISMO CAUSAL <i>FUSARIUM SP.</i> ....	43
<b>FIGURA 11.</b> (A) MEDIO DE CULTIVO YPG MÁS EL REACTIVO TRITÓN X 100, (B) MEDIO DE CULTIVO YPG INOCULADO CON EL MICROORGANISMO CAUSAL.....	44
<b>FIGURA 12.</b> GEL DE INTEGRIDAD DEL MATERIAL GENÉTICO (ADN) PROVENIENTE DE LAS MUESTRAS AISLADAS DE LOS FITOPATÓGENOS FÚNGICOS.....	50
<b>FIGURA 13.</b> CORRESPONDIENTE A LA PCR DE LOS AGENTES FITOPATÓGENOS.....	52

## Abreviaturas

µg	Microgramo
µm	Micrómetro
µL	Microlitro
°C	Grado centígrado
Ac	Acido
Abs	Absorbancia
ADN	Acido desoxirribonucleico
ADNc	Acido desoxirribonucleico complementario
APD	Agar papa dextrosa
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
c.b.p	Cuanto basta para
g	Gramo
GPS	Sistema portátil de geoposicionamiento global
ha	Hectárea
h	Hora
M	Molar
m	Metro
Méx	México
mg	Miligramo
min	Minuto
mm	Milímetro
mL	Mililitro
msnm	Metros sobre el nivel del mar
nm	Nanometro

pb	Pares de base
PBS	Solución salina amortiguadora por Fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
pH	Potencial hidronio
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	PCR en transcriptasa inversa
seg	Segundo
STD	Estándar
vel	Velocidad
vol	Volumen
YPG	Extracto de levadura peptona de gelatina y glucosa



## I RESUMEN

La región de los Reyes de Salgado es un valle con un vocación agrícola, la apertura económica de México a través, de los tratados de libre comercio con Estados Unidos de América, Canadá, Europa y Chile han permitido el desarrollo de una incipiente agroindustria, en la cual esta región se ha enfocado desde hace 15 años al desarrollo de especies del genero *Rubus*, en donde se tienen productos como zarzamora, frambuesa y arándanos, los cuales tienen como destino principal los Mercados internacionales, generando una derrama económica importante en las Municipios de Los Reyes, Peribán y Tocuambo, permitiendo la ocupación de hasta 60 mil puestos laborales.

La problemática en este tipo de cultivos *Rubus fruticosus* es que se ven afectados por agentes fitopatógenos, los cuales tienden a desencadenar una enfermedad conocida como *antracnosis* causada por un hongo del género *Colletotrichum*, que es un tipo muy común de fitopatógenos y que son responsables de enfermedades en las especies vegetales, en todo el mundo. Generalmente la identificación del género *Colletotrichum* se basa en más de una característica, como la apariencia física y la patogenicidad en el huésped. Muchas especies de *Colletotrichum* infectan a más de un hospedero y puede dificultar la identificación diferencial de más de un fitopatógeno, como por ejemplo *Fusarium*. El presente trabajo presenta una metodología molecular y micológica que permite la identificación del genero *Colletotrichum* y *Fusarium*, en el género comercial *Rubus*, así como generar las herramientas moleculares, para la preservación de esta agroindustria en el estado y que es un referente mundial, finalmente se obtienen datos por geoposicionamiento global, a través de parámetros de longitud, latitud y altitud sobre el nivel del mar, que permiten identificar in situ los puntos en donde se presentan los focos de infección por el fitopatógeno.

## II. INTRODUCCIÓN

El cultivo de la zarzamora inició en el año de 1994 con 4 o 5 plantaciones comerciales de la variedad brassos, cuya superficie no excedía las 3 hectáreas. Actualmente el cultivo de esta fruta abarca 4 mil 500 hectáreas, de las cuales 3 mil 750 hectáreas están en la jurisdicción de Los Reyes y el resto en Tocumbo y Peribán. La producción del ciclo 2011 arrojó 30 mil toneladas de zarzamora, de las cuales el 90 por ciento se exportó a Estados Unidos, como principal mercado, y el resto a Europa y Japón. La producción del valle de los Reyes representa el 95 por ciento a nivel estatal y el estado de Michoacán tiene más del 90 por ciento de la superficie nacional sembrada con esta especie. (Vidales, 1999, Ayuntamiento de Ziracuaretiro).

### 2.1 Descripción de la Zarzamora

El grupo de las frutillas incluye a todos aquellos frutos usualmente comestibles de pulpa suave, en formas redondas y tamaño pequeño (Galleta y Himelrick, 1990). La zarzamora pertenece al grupo de frutales cuya producción es incipiente, pero potencialmente importante, es al que se les denomina globalmente “frutales menores”. Entre ellas se encuentra la zarzamora.

La denominación de “frutales menores” no significa que el término de “frutillas” que ha adoptado en México sea correcto, pues en el ámbito del mercado existe una fruta conocida con el nombre de “frutilla” y que en nuestro país se conoce con el nombre de tiesa. De hecho, la “frutilla” ha sido clasificada como fragaria, mientras que la zarzamora pertenece al género *Rubus*.

Dado que en nuestro país existe escaso conocimiento de estos berries, hay una gran confusión en sus nombres y en la sinonimia que corresponde a los nombres usados en otros países; por ello resulta conveniente aclarar la equivalencia que existe entre las diversas denominaciones.

Debido a que la zarzamora de nuestro interés se agrupan en el género *Rubus* pertenece a la familia de las rosáceas y sus especies son las llamadas Br-ambles o Canfe fruits en inglés y zarza o zarzamora en castellano. (Muñoz M. *et al.*, 2012).

### 2.1.1 Taxonomía

**Nombre Común** *Rubus ulmifolius* (zarzamora)

**Reino:** Plantae

**Division:** Magnoliophyta

**Clase:** Magnoliopsida

**Orden:** Rosales

**Familia:** Rosaceae

**Subfamilia:** Rosoideae

**Tribu:** Rubeae

**Rubus:** Rubus

**Subgénero:** Eubatus

**Nombre binomial:** *Rubus fruticosus*

### 2.2 Variedad de Zarzamora

Los híbridos son el producto del cruzamiento entre varios *Rubus* de frutos nativos de Norteamérica y de Europa, con *Rubus fruticosus*. Se les agrupa bajo el nombre de blackberries en inglés y zarzamora en México. *Zarzamora variedad Tuppi* es una variedad híbrida, que es fruto de las variedades de “Comanche” y “Uruguay”. Esta es la variedad principal en México. La variedad “Tupi” es una planta con grandes espinas muy vigorosa de porte erecto que produce grandes frutas de coloración uniforme de sabor equilibrado por su acidez y contenido de azúcar, el fruto es firme con semillas pequeñas, piel resistente y aroma atractivo. (Santos y Raseira, 1988). Su temporada larga e ininterrumpida de crecimiento de octubre a junio permite a los consumidores disfrutar de nuevas moras Tupi mucho después del final de la temporada de crecimiento en América del Norte.

### 2.3 Importancia económica

El costo promedio de la caja de zarzamora con dos kilogramos de peso oscila en 60 pesos, por tanto, con base en el volumen, se estima que el valor de la producción anual, cuya temporada va de octubre a junio, ronda los mil 100 millones de pesos. Luego de 2 años de daños provocados por las contingencias climatológicas se reporta una mejora en la producción de zarzamora, alcanzando en la actual temporada, una producción de unas 15 millones de cajas. Es de mencionar que por las lluvias registradas en el primer

bimestre del año se afectó una superficie considerable, provocando la pérdida diaria de unas 85 mil cajas de frutilla.

Actualmente el Valle de Salgado de los Reyes, tiene la mayor superficie con zarzamora en el mundo. A escala nacional e internacional México y particularmente Michoacán, ocupan el primer lugar en producción y exportación de frutillas rojas, actividad a la que se dedican unos mil cien productores solamente en el valle de Los Reyes, de los cuales el 60 por ciento es mujer y el resto hombre que dan trabajo a una población de 60 mil personas diariamente en la época de producción. (Hernández-Gonzales, 2011).

Los cambios climatológicos severos en los cuales existe un aumento en la precipitación pluvial, permite la proliferación de especies de microorganismos fitopatógenos de tipo fúngico que provocan pérdida de frutos y por ende una fluctuación negativa en la producción de especies del género *Rubus*, al cual pertenecen las especies comerciales explotadas en la región de los Reyes como los arándanos, frambuesas y zarzamoras son susceptibles de ser infectadas por microorganismos fúngicos como *Fusarium oxysporum* (Nita-Lazar, et al., 2002, Nita-Lazar, et al., 2004), así como de otros géneros fitopatógenos.

Los hongos fitopatógenos, causan desordenes fisiológicos o genéticos, deficiencia en los nutrientes y estrés ambiental en plantas e insectos polinizadores, estos cambios están mediados por enzimas líticas como por ejemplo pectinasas, gluconasas, xilanasas y una batería de metabolitos fúngicos como carotenoides y micotoxinas, los cuales pueden poner en riesgo la viabilidad de los cultivos comerciales del género *Rubus*. (Benhamou *et al.*, 1990; Alconada-Martinez, 1995; Christakopoulos *et al.*, 1996).

La identificación para especies de fitopatógenos fúngicos como *F. oxysporum* y del *Colletotrichum sp.* (Afanador et al., 2003) se apoya en el aislamiento del microorganismo y su identificación por morfología, más adicionalmente se está apoyando la identificación a través de estrategia moleculares en donde el contar con los oligonucleótidos específicos para especies de *F. oxysporum* y del genero *Colletotrichum sp.* conduce a una identificación en un menor tiempo reduciendo tiempos de cultivo e identificación de 7 días a 2 días traduciéndose en reducción de costos y competitividad de los cultivos.

### III. ANTECEDENTES

#### 3.1 Hongos fitopatógenos

Los patógenos infecciosos son de naturaleza variada e incluyen virus, tiroides, bacterias, hongos, algas, plantas superiores y nematodos capaces de penetrar y establecer una directa y compleja relación parasitaria con el agente hospedero, al mismo tiempo, son agentes transmisibles desde una planta enferma a una sana, por lo cual se les denomina agentes infectivos. Dentro de los agentes causales del tipo infectivo que provocan enfermedad en plantas, se destacan los hongos quienes constituyen el grupo más importante y pertenecen a diversas categorías taxonómicas.

Los hongos se definen como miembros del reino fungí, y consisten en un talo carente de clorofila, microorganismos eucariontes, usualmente filamentosos, ramificados, formadores de spora, unicelulares o multicelulares, no utilizan la luz solar como fuente de energía la pared de células está formada por quitina, celulosa o ambas. Algunos hongos pueden crecer y multiplicarse solo por la asociación con su planta hospedera, durante toda su vida, estos se conocen como parásitos obligados o biotrofos. Otros, requieren la planta como hospedero para realizar parte de sus ciclos de vida, quienes lo pueden completar en materia orgánica en descomposición, así como también crecer y multiplicarse allí, denominados parásitos no obligados (De la Isla, 1994)

#### 3.2 Riesgos fitopatológicos:

Los hongos fitopatógenos entre ellos las especies del género *Colletotrichum sp.* y *Fusarium sp.* representan un problema en la producción de diversos cultivos en donde destacan a nivel local la producción de *Persea americana variedad Hass* (aguacate) (Medeiros, *et al.*, 2010) produciendo las lesiones clásicas denominadas antracnosis, sin embargo, la problemática de la antracnosis comienza a presentarse en cultivos de las denominadas “frutillas rojas” en donde destacan por el tamaño de superficie cultivada la zarzamora *Rubus fruticosus*, estas lesiones afectan al producto final de comercialización, el fruto, y lo convierten en pérdidas para el productor, así como convertir al fruto infectado como un vector de riesgo fitosanitario para otros cultivos de interés comercial como por ejemplo los pertenecientes a los miembros del genero *Vaccinium sp.* (arándanos) que son también cultivados en la región de Los Reyes, Tocuambo y Peribán.

### 3.3 Organismos causales

La antracnosis es causada por un hongo del género *Colletotrichum sp.*, que es un tipo muy común de patógenos de plantas, y que son responsables de enfermedades en las especies vegetales en gran parte del mundo. Las principales especies de las que se sabe son *C. gloeosporioides*, *C. capsici* y *C. coccodes*. (Departamento de Patología Vegetal, Gainesville, s.f.)

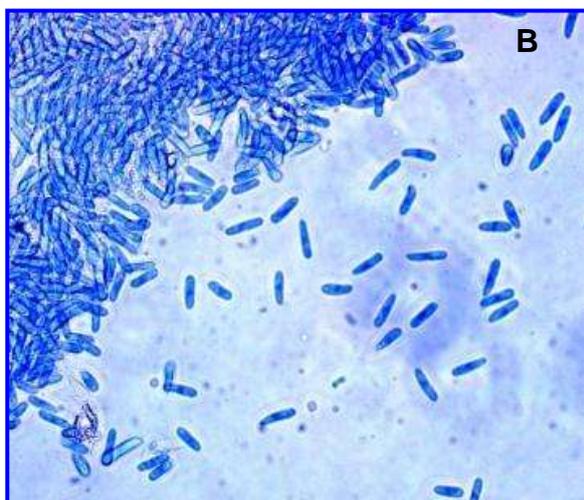
Así como mencionamos con anterioridad también encontramos como agente causal al *Fusarium oxysporum* causal de antracnosis con características sintomatológicas parecidas a las del fitopatógeno *Colletotrichum sp.* A continuación se describen brevemente nuestros principales agentes fitopatógenos sospechosos:

#### 3.3.1 *Colletotrichum gloeosporioides*

Es conocido por infectar a una amplia variedad de huéspedes. Entre los hospederos se pueden citar desde los tropicales como la papaya, el plátano, hasta los pimientos y frutos de climas sub-tropicales como mango y de zonas boscosas como aguacate entre los principales.

Cuenta con una distribución cosmopolita, es un parásito facultativo. *C. gloeosporioides* produce hifas hialinas, unicelulares, estas en forma de ovoides a oblongas, ligeramente curvo o con mancuernas en forma de conidios, estas cuentan con un tamaño de 10-15 micras de longitud y 5.7  $\mu\text{m}$  de ancho, cabe destacar que el agente fitopatógeno cuenta también con masas de conidios de color rosado o de color salmón. La cera de los acérvulos, que se producen en los tejidos infectados, es sub-epidérmicas, por lo general con setas simples, conidióforos cortos, erectos (Burger *et al.*, 1921). (**Figura 1.**)

Clasificación científica		A
Reino :	<i>Fungi</i>	
Phylum :	<i>Ascomycota</i>	
Clase:	<i>Sordariomycetes</i>	
Orden:	<i>Phyllachorales</i>	
Familia :	<i>Phyllachoraceae</i>	
Género :	<i>Colletotrichum</i>	



**Figura 1.** (A) Clasificación científica de *Colletotrichum gloeosporioides*; (B) Imagen de conidios. (C) Cultivo de *Colletotrichum gloeosporioides* (medio utilizado Agar Papa Dextrosa) (Cesar Calderón, 2009)

### 3.3.2 *Colletotrichum coccodes*

Es un fitopatógeno de las plantas, siendo *Colletotrichum coccodes* una de las especies principales causantes de la antracnosis en el cáñamo y el tomate así como de la enfermedad de punto negro de la papaya los cuales cabe mencionar son algunos de sus principales hospederos.

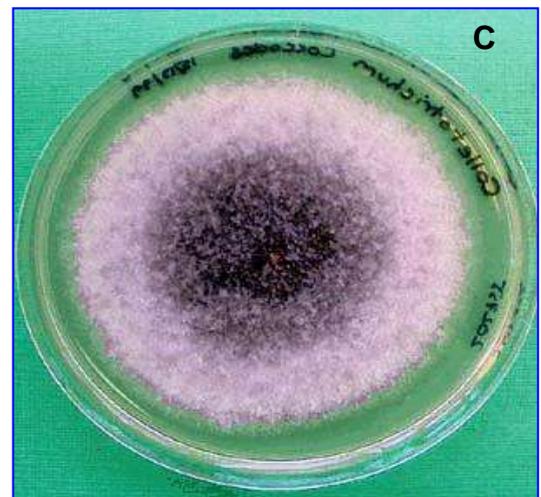
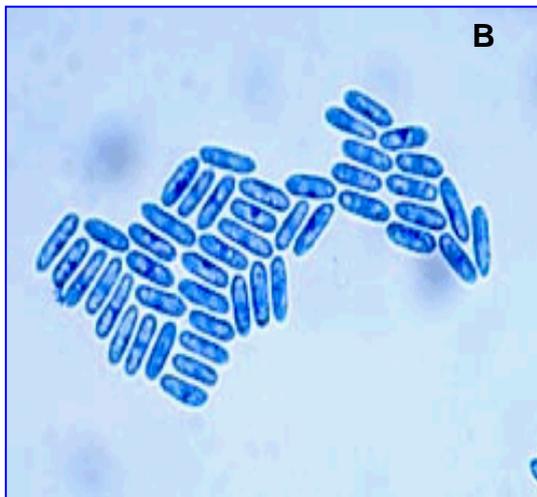
Cuenta con una distribución cosmopolita, las colonias generalmente son de color oscuro y cuentan con micelio aéreo pigmentado de un color blanco a marrón, el hongo está conformado por numerosos esclerocios de un color negro y masas de conidios de color marrón claro, las cuales se observan por su lado inverso con una coloración marrón oscuro (Larran *et al.*, 2001), (**Figura 2.**).

Los esclerocios son generalmente abundantes, cubierto de múltiples cerdas, esférico y a menudo confluentes. El agente fitopatógeno cuenta con conidióforos rectos, fusiforme, atenuado en los extremos, con un tamaño de 16-22 X 3-4  $\mu\text{m}$ . Destacar la presencia de apresorios o aplanados de las hifas al tiempo de germinación de conidiosporas del agente fitopatógeno, son comunes, se suele observar una consistencia cerosa, con una coloración marrón y un tamaño que alcanza de los 11-6 X 16,5-9.5 $\mu\text{m}$ , así como de una forma variable (Brandán de Antoni *et al.*, 2009).

#### 3.3.2.1 Información de interés clínico:

Se han reportado más de 500 especies de *Colletotrichum*. *C. coccodes* es un fitopatógeno común de suelo y planta ampliamente distribuido en África, Asia, Australasia, Europa y América. Se ha informado de un caso de queratitis micótica humana (queratomicosis) (Ellis D, 2012).

Clasificación científica A	
<b>Reino:</b>	Hongos
<b>Filo:</b>	Ascomycota
<b>Suborden:</b>	Pezizomycotina
<b>Clase:</b>	Sordariomycetes
<b>Orden:</b>	Glomerellales
<b>Familia:</b>	Glomerellaceae
<b>Género:</b>	<i>Colletotrichum</i>
<b>Especie:</b>	<i>C. coccodes</i>



**Figura 2.** (A) Clasificación científica de *Colletotrichum coccodes*; (B). Imagen de las conidias; (C) Cultivo de *Colletotrichum coccodes* (medio utilizado Agar Papa Dextrosa). (Ellis, 2012)

### 3.3.3 *Fusarium oxysporum*:

El género *Fusarium* pertenece a los *Ascomycetos* y comprende especies que se caracterizan por la presencia de macroconidios fusiformes. Algunas de ella son importantes patógenos de plantas o productores de micotoxinas contaminantes de alimentos. *F. oxysporum* es la especie más común de este género. Dentro de la especie hay más de 120 formae especiales descritas que afectan a una gran variedad de cultivos como algodón, tomate, tabaco, melón, garbanzo, plátano, caña de azúcar café entre otros (Agrios, 2001).

**3.3.3.1 Aspecto de la colonia** En agar YPG (extracto de levadura peptona de gelatina y glucosa) el diámetro: 50 mm en una semana, topografía: lisa, textura: al principio algodonosa para terminar como el fieltro, color: desde blanco hasta salmón pálido; generalmente tiene un tinte púrpura.

**3.3.3.2 Aspecto microscópico** Características predominantes: microconidias abundantes y ovales mezcladas con una menor cantidad de macroconidias en forma de media luna; pueden verse clamidosporas grandes y redondeadas solitarias o en parejas.

**Conidióforo:** fiálides cortas que se afilan hacia la punta con collarettes poco definidos. Solitarias o en agrupaciones ramificadas.

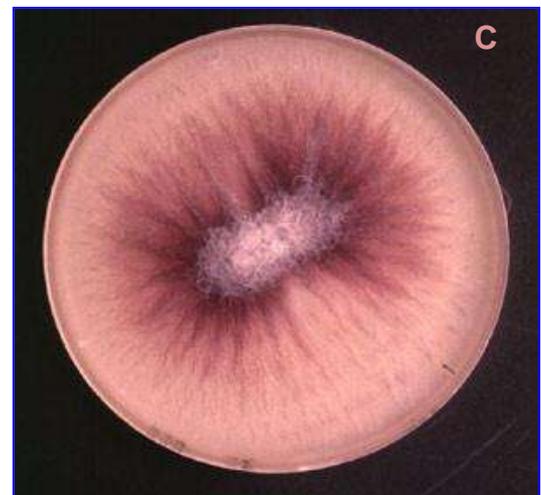
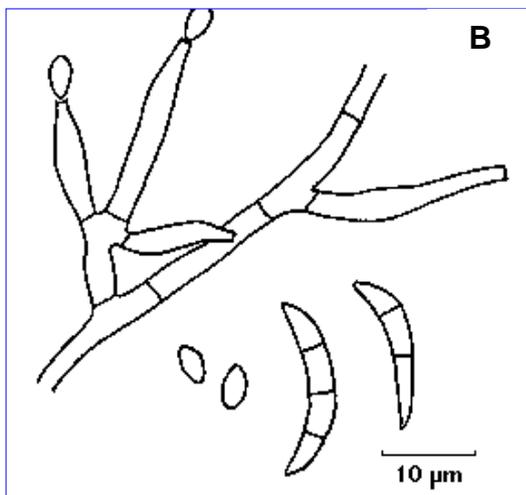
**Macroconidia:** de 2 a 5 septos con forma de media luna. La célula basal es claramente identificable y con el extremo puntiagudo.

**Microconidia:** abundantes, pequeñas, ovales o en forma de riñón; ocasionalmente tienen 1 o 2 septos. Obsérvese la **Figura 3**.

#### 3.3.3.3 Información de interés clínico

Es un patógeno de plantas común. Puede causar infección corneal y onicomycosis en pacientes sin inmunocompromiso. También puede causar infección diseminada fatal en pacientes neutropénicos. La queratitis fúngica debida a especies de *Fusarium* produce una rápida afectación de la córnea con pérdida de visión. Es difícil de tratar. Se recomienda la extirpación quirúrgica del material infectado, suspender cualquier corticoide sistémico o local y realizar tratamiento tópico. Se debe evaluar la necesidad de añadir tratamiento sistémico. La onicomycosis es muy difícil de tratar requiriendo extirpación quirúrgica de la uña (GEFOR, 2011).

Clasificación científica. A	
Reino:	Hongos
División:	<i>Ascomycota</i>
Clase:	<i>Sordariomycetes</i>
Orden:	<i>Hypocreales</i>
Familia:	<i>Nectriaceae</i>
Género:	<i>Fusarium</i>
Especie:	<i>F. oxysporum</i>



**Figura 3.** (A) Clasificación científica de *Fusarium oxysporum*; (B) Imagen de los conidióforos y macroconidias en forma de media luna; (C) Cultivo de *Fusarium oxysporum* (medio utilizado YPG). (GEROF, 2011).

### 3.4 Los síntomas

*Colletotrichum sp.* así como *Fusarium sp.* son capaces de causar antracnosis en prácticamente todas las partes de la planta durante cualquier etapa del crecimiento de la misma. Sin embargo, las lesiones de la fruta son el aspecto de mayor importancia económica de esta enfermedad (Trujillo et al., 1999).

Esta patología se expresa principalmente cuando los frutos comienzan a madurar, causando manchas necróticas depresivas, sobre la superficie del tejido, especialmente en condiciones de mal manejo durante el transporte y almacenamiento del producto. Además de las lesiones externas que causa, el hongo penetra el interior del fruto, alterando la pulpa y causando pudriciones de tejidos internos (Avilan, et al., 1992). Las lesiones pueden cubrir la mayor parte de la superficie de la fruta y pueden ser múltiples como a continuación se describen:

La superficie de la lesión se cubre con las esporas húmeda y gelatinosa de color salmón cuerpos de fructificación de hongos (acérvulos) con numerosas espinas negro (setas).

Anillos concéntricos de los acérvulos son comunes dentro de las manchas de la fruta.

En algunos casos, las lesiones son de color marrón, negro y luego de la formación de setas y esclerocios (una estructura oscura, la supervivencia de hongos).

### 3.5 Ciclo de la enfermedad y epidemiología:

El hongo sobrevive en y sobre las semillas. La antracnosis es introducida en el campo de los trasplantes infectados o que puede sobrevivir entre las estaciones de restos vegetales o en máquinas de malezas. Hospederos alternativos incluye las malas hierbas y otras plantas solanáceas (jitomate, papa, berenjena), aunque las infecciones de estas máquinas son extremadamente raras (Abang, 2003).

A continuación se citan las principales teorías por las cuales se cree que hay infección tanto de plantas como frutos. El principal mecanismo de transmisión es mediante el salpique durante la época lluviosa, así como por animales, herramientas y dispersión por el viento. Nuevas esporas se producen en el tejido infectado y luego se dispersan a otras frutas. Obsérvese **Figura 5**.

Los trabajadores también pueden mover las esporas con el equipo o durante la manipulación de las plantas infectadas, esta es una de las teorías de las que se cree tiene más relevancia en cuanto a la dispersión de un cultivo a otro, hablemos de una especie a otra. (Universidad de Florida, 2001).

Por otra parte después de realizar un muestreo de la calidad del agua, la cual es utilizada para el riego de los cultivos, se ha encontrado que esta podría ser otra vía de contaminación de nuestros cultivos de estudio.

La infección ocurre usualmente durante el clima cálido y húmedo a temperaturas alrededor de 27° C en donde se tiene las condiciones óptimas para el desarrollo de la enfermedad, aunque la infección se produce a temperaturas altas y bajas. Pérdidas graves se producen durante la temporada de lluvias por las esporas salpicando a otras frutas provocando más infecciones. Obsérvese **Figura 4**.

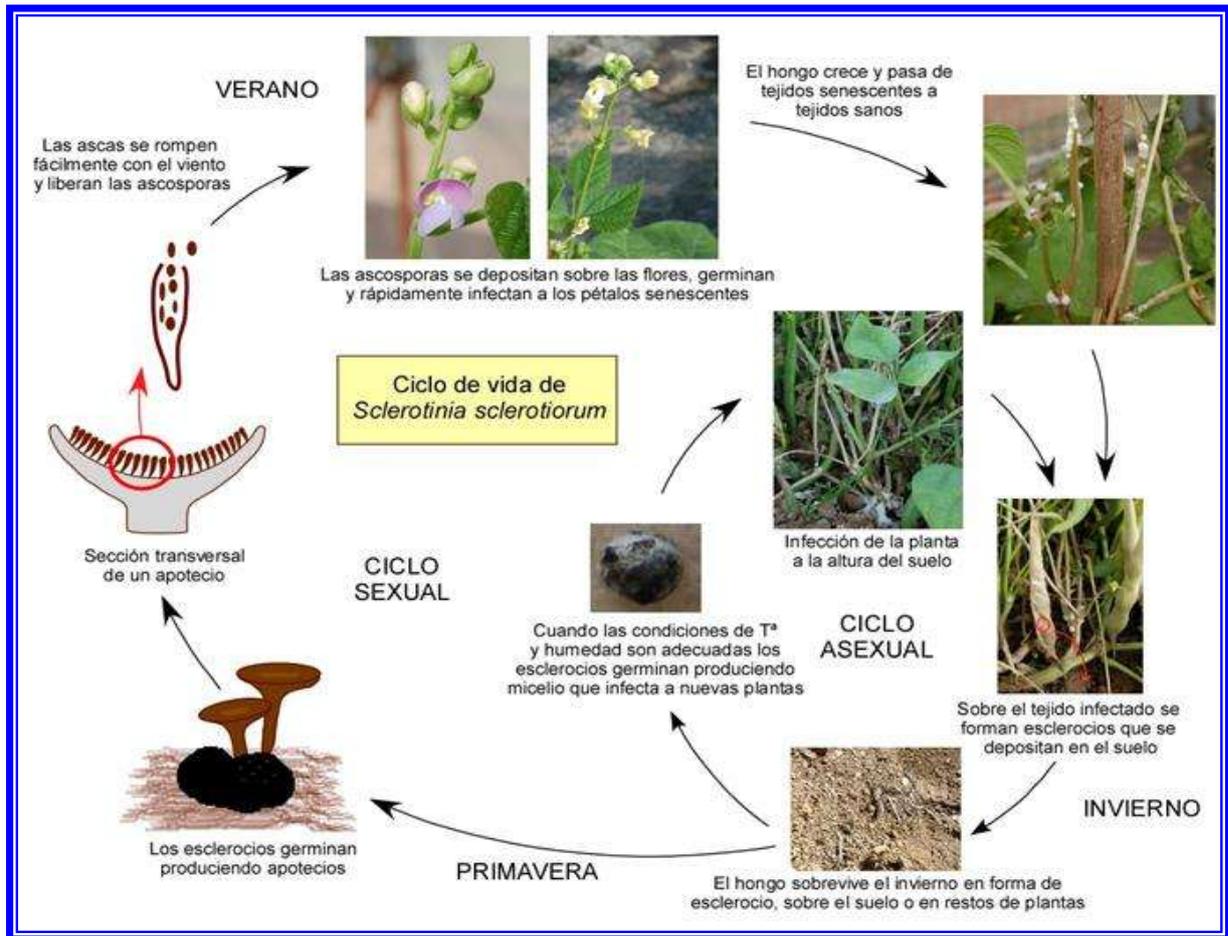


Figura 4 Ciclo de Vida (Alves, et al., 1999)



**Figura 5** *Colletotrichum gloeosporoides*. Reproducción, Infección y ciclo de vida de la enfermedad (EARTH, 2011)

### **3.6 Técnicas de biología molecular**

Las técnicas de biología molecular han sido uno de los avances con mayor impacto, tanto en la investigación básica como en ciencias aplicadas en los últimos años, debido a su gran sensibilidad y especificidad, permitiendo un conocimiento cada vez más profundo de diversas especies patógenas, facilitando en gran medida su identificación.

Una de las técnicas más utilizadas en este campo y de las cuales nos servirán para este proyecto es la Reacción en Cadena de la Polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de una mínima cantidad. Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de las ADN polimerasas para replicar hebras de ADN, para lo cual se emplean ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de ADN recién formadas entre si tras cada fase de replicación y a continuación, dejar que vuelvan a unirse a polimerasas para que vuelvan a duplicarlas (Sambrook, J. & Russel, D, W 2001).

La técnica como su nombre lo indica, se basa en la enzima ADN polimerasa que sintetiza una cadena de ADN complementaria (ADNc) a otros que sirven de molde. Los únicos elementos que necesita son nucleótidos (dNTP's) y dos pequeñas cadenas de ADNc al molde que se desea copiar y que lo flanquea, llamadas cebadores o primers en ingles a partir de los cuales la polimerasa elonga la cadena (Santos, 2009).

También hacerse notar que existen diversas variantes de la PCR, que puede utilizarse en distintos estudios en este caso se utilizó un tipo llamado RT-PCR (PCR en transcriptasa inversa), en la cual sigue el mismo proceso de la PCR clásica con la excepción de que en esta el molde inicial es ARN y se requiere de una transcriptasa inversa, esto para realizar la conversión de ARN aun tipo de ADN llamado ADNc (Watson, *et al.*, 2004).

### **3.7 Técnicas de muestreo**

Para aumentar la precisión y exactitud de los sitios de muestreo se utilizó el sistema de geoposicionamiento global. Las enfermedades causadas por hongos son algunos de los principales problemas que afectan a las zarzamoras, algunos de estos hongos presentan similitudes en cuanto a los síntomas manifestados en las plantas, lo cual conlleva a una

difícil identificación del fitopatógeno y así mismo a la adopción de medidas adecuadas de prevención y control. La investigación orientada a la identificación de microorganismos fitopatógenos es de vital importancia para el desarrollo de planes de contención en cultivos de interés, siendo fundamental que el acceso a material de soporte de calidad, el cual es actualmente deficiente debido a la falta de aportes públicos por parte de quienes desarrollan estudios referentes al tema.

Lo que requiere acceso a equipos con técnicas avanzadas de observación obteniendo un excelente material gráfico que sirva como herramienta para la identificación y caracterización morfológica, evitando confusiones entre microorganismos y asegurando la obtención de diagnósticos confiables y la toma de medidas de control efectivas. Las investigaciones se han centrado en la solución de problemas existentes, sin generar documentos que permitan su consulta posterior. Por otro lado debido a que los controles de sanidad vegetal son fundamentales como criterio de aceptación de producto, y eje central en las regulaciones para la prevención de enfermedades, con material gráfico que proporcione su geoposicionamiento en la detección de microorganismos patógenos, es indispensable como instrumento de referencia para la identificación confiable de estos y el logro de un enfoque preventivo correcto, lo que contribuye al beneficio del sector.

#### IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hasta la fecha en el estado de Michoacán, no existen reportes científicos que aborden la caracterización biológica, aislados a partir de lesiones de antracnosis producidas en el cultivo extensivo de zarzamora variedad *tupi* (*Rubus fruticosus* variedad *tupi*), explotada comercialmente en la agroindustria de Michoacán.

## V. JUSTIFICACIÓN DE LA PROPUESTA

En la actualidad el cultivo comercial de frutillas rojas en México y particularmente en Michoacán son un referente mundial, más lo reciente (1996 a la fecha) de la explotación comercial y su incipiente tecnificación agroindustrial en la región de los Reyes no ha permitido afrontar los problemas de fitopatógenos fúngicos que afectan a este cultivo, en donde es necesario contar con Laboratorios de Microbiología que realicen la identificación de este tipo de microorganismos, La Facultad de Químico Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo posee los laboratorios dedicados al estudio de microorganismos fúngicos así como las herramientas moleculares correspondientes, y el Instituto Tecnológico Superior de Los Reyes a través del departamento de Innovación Agrícola que permite la incorporación de herramientas de geoposicionamiento.

## VI. HIPÓTESIS

Se identificara y caracterizara a través de biología molecular a los hongos fitopatógenos *Colletotrichum sp.* y *Fusarium sp.* en las especies de *Rubus fruticosus* variedad tupi cultivada en la región de Valle de los Reyes Michoacán.

## VII. OBJETIVOS

### 7.1 Objetivo general

Mediante técnicas de aislamiento, herramientas moleculares y de geoposicionamiento se realizará la identificación y caracterización de *Colletotrichum sp.* y *Fusarium sp.* en *Rubus fruticosus* variedad tupi cultivada en la región de Valle de los Reyes Michoacán.

### 7.2 Objetivos específicos

- Aislar e identificar morfológicamente agentes fitopatógenos de los género *Colletotrichum sp.* y *Fusarium sp.* a partir de muestras biológicas de los cultivos.
- Seleccionar los puntos de muestreo biológico a través del Sistema de Geoposicionamiento Global.
- Identificar molecularmente a especies de los microorganismos *Colletotrichum sp.* y *Fusarium sp.* a partir de muestras biológicas de los cultivos del genero *Rubus fruticosus*.

## VIII. MATERIAL Y MÉTODOS

### 8.1 Medios de cultivo

#### 8.1.1 Agar papa dextrosa (APD) J.T. Baker.

Uso: El Agar Dextrosa y Papa es un medio utilizado para el cultivo de hongos y levaduras a partir de muestras de alimentos, derivados de leche y productos cosméticos.

Fundamento: el Agar Dextrosa y Papa puede ser suplementado con antibióticos o ácidos para inhibir el crecimiento bacteriano. Este medio es recomendado para realizar el recuento colonial. También puede ser utilizado para promover el crecimiento de hongos y levaduras de importancia clínica. La base del medio es altamente nutritiva y permite la esporulación y la producción de pigmentos en algunos dermatofitos. Algunos procedimientos señalan bajar el pH del medio a  $3.5 \pm 0.1$  con ácido tartárico al 10 %, para inhibir el crecimiento bacteriano. La infusión de papa promueve un crecimiento abundante de los hongos y levaduras y el agar es adicionado como agente solidificante. (Tabla 1).

<b>Tabla 1: Formulación APD</b>	
<b>Infusión de Papa</b>	<b>4.0g</b>
<b>Dextrosa</b>	<b>20.0g</b>
<b>Agar Bacteriológico</b>	<b>16.0g.</b>
<b>pH</b>	<b>5.6 ± 0.2</b>
<b>Fórmula aproximada para 1000mL de agua destilada.</b>	

Método: Suspender 39 g del medio en un litro de agua destilada. Calentar con agitación suave hasta su completa disolución y hervir durante un minuto. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos. Enfriar a una temperatura entre 45-50 °C y vaciar en placas de Petri estériles.

Almacenamiento: 2-30° C.

### **8.1.2 Agar nutritivo estándar J.T. Baker.**

Uso: El agar nutritivo es utilizado para el cultivo de una amplia variedad de microorganismos.

Fundamento: A principios de 1900 la APHA (American Public Health Association) sugirió esta formulación como un medio de cultivo estándar para el análisis de agua. El Agar Nutritivo se encuentra descrito en los Métodos Estándar de la APHA y de la AOAC (Association of Oficial Analytical Chemists) para el análisis de agua, leche y sus derivados, alimentos y otros materiales.

El Agar Nutritivo sigue siendo un medio ampliamente utilizado para el cultivo de microorganismos no fastidiosos. En este medio el extracto de carne y la peptona aportan la fuente de nitrógeno, vitaminas y carbono. El agar es adicionado como agente solidificante (**Tabla 2**).

<b>Tabla 2. Formulación Agar Nutritivo estándar J.T. Baker.</b>	
<b>Peptona de Gelatina</b>	<b>5.0g</b>
<b>Extracto de Carne</b>	<b>3.0g</b>
<b>Agar Bacteriológico</b>	<b>15.0g</b>
<b>pH</b>	<b>6.8 ± 0.2</b>

Método: Suspender 23 g del medio en un litro de agua destilada. Calentar con agitación suave hasta su completa disolución y hervir durante un minuto. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos. Dejar enfriar a una temperatura entre 45-50°C y vaciar en placas de Petri estériles.

Procedimiento: Inocular las placas con una asada y sembrar por el método de estría, Incubar las placas a 35° C durante 18 a 24 horas.

Almacenamiento: 2-30° C.

### **8.1.3 Agar (sólido/líquido) YPG SIGMA- ALDRICH**

Uso: Utilizado para el cultivo de una amplia variedad de microorganismos.

Fundamento: Este medio es recomendado para realizar el recuento colonial. También puede ser utilizado para promover el crecimiento de hongos y levaduras de importancia clínica. (Bartnicki, *et al.*, 1962).

La base del medio es altamente nutritiva y permite la esporulación y la producción de pigmentos en algunos dermatofitos. **(Tabla 3)**.

<b>Tabla 3. Formulación YPG</b>	
<b>Extracto de levadura</b>	<b>0.3%</b>
<b>Peptona</b>	<b>1%</b>
<b>Glucosa</b>	<b>2%</b>
<b>Agar</b>	<b>3%</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>c.b.p. 1000mL</b>
<b>pH</b>	<b>4.5± 0.2</b>

Método: Suspender el medio un litro de agua destilada. Calentar con agitación suave hasta su completa disolución y hervir durante un minuto. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos. Dejar enfriar a una temperatura entre 45-50°C.

Procedimiento: Inocular el medio por medio de una asada y agitar en el mismo.

Almacenamiento: 2-30°C.

Medio nutritivo para evitar el crecimiento radial del agente fitopatógeno.

## **8.2. Reactivos**

### **8.2.1 Triton X-100 SIGMA- ALDRICH.**

Fórmula molecular:  $C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_n$ .

Sinónimos: octil fenol etoxilato, polioxietilen Octil fenil éter.

Aspecto: Líquido.

Solubilidad: Agua, alcohol etil isopropílico, tolueno, xileno y la mayoría de los solventes clorados.

pH: 6.0 a 8.0 en solución acuosa al 5%.

8.2.2 Buffer TAE 50X (Tabla 4)

<b>Tabla 4. Formulación Buffer TAE 50%</b>	
<b>Trizma – Base (Sigma- Aldrich)</b>	<b>121g</b>
<b>Ácido acético (J.T. Baker)</b>	<b>28.6 mL</b>
<b>EDTA Concentración 0.5M pH 8.0.</b>	<b>50 mL</b>
<b>Agua bidestilada</b>	<b>c.b.p. 500 mL</b>

Preparación:

Colocar en matraz aforado de 500 mL 121g de Trizma – Base (Sigma- Aldrich) en 250mL de agua bidestilada y agitar hasta disolución completa.

Proceder a agregar 28.6 mL de ácido acético (J.T. Baker) y agitar, adicionar 50 mL de EDTA (Ac. Etilendiaminotetraacetico) Concentración 0.5M/pH 8.0 y agitar cuidadosamente, completar aforo a 500 mL con agua bidestilada y envasar.

### **8.2.3 Gel de agarosa (1.5 %). (Tabla 5).**

Preparación:

Pesar en balanza analítica 0.75g de agarosa para electroforesis (sigma – Aldrich) colocar el vaso de precipitado.

Con ayuda de probeta graduada medir un vol. de 50 mL de buffer TAE 1x y verter en el vaso de precipitado, disolver mediante calor utilizando parrilla eléctrica u horno de microondas.

Verter al molde para electroforesis y dejar enfriar un poco, agregar el bromuro de etidio con mucha precaución antes de la solidificación de nuestro gel proceder a agitar y dejar solidificar  $\pm$  25min.

**Tabla 5.** Formulación gel de agarosa.

<b>Agarosa para electroforesis (Sigma - Aldrich)</b>	<b>0.75 g</b>
<b>Buffer TAE 1X</b>	<b>50 mL</b>
<b>Bromuro de etidio (Sigma - Aldrich)</b>	<b>10 mg/mL</b>

### 8.3 Equipo

#### 8.3.1. Sistema portátil de geoposicionamiento global (GPS) (Tabla 6)

<b>Tabla 6. Datos del equipo de geoposicionamiento</b>	
<b>Marca</b>	<b>GARMIN</b>
<b>Modelo</b>	<b>GPS map. 60X</b>
<b>Georeferencia</b>	<b>Longitud, Latitud y Altitud sobre el nivel del mar</b>
<b>Margen de error</b>	<b>± 3 m.</b>



**Figura 6** Equipo utilizado para extracción de ácidos nucleicos de nueva generación ZYMO RESEACH, (ZR Fungal / Bacterial DNA MiniPrep) biosistemas avanzados S.A. de C.V.

#### 8.4. Aislamiento y geoposicionamiento de hongos Fitopatógenos

1. Se recolectaron muestras de 9 sitios en los que se cultiva el género *Rubus fruticosus* que presentaban síntomas característicos de un ataque por fitopatógenos, los que presentaron manchas y pudriciones en hojas y frutos respectivamente, procediendo a márcalas identificando el sitio donde fueron tomadas.
2. Se utilizó un sistema portátil de geoposicionamiento global (GPS) marca GARMIN modelo GPSmap 60X, que permitió la obtención de la georeferencia de longitud, latitud y altitud sobre el nivel del mar (el cual posee un margen de error de  $\pm 3$  m. de los sitios de los cuales se tomaron las muestras biológicas.
3. Se lavaron con agua destilada estéril perfectamente follaje, tallos y frutos.
4. Se prepararon y vaciaron en los medios STD, APD y YPG en cajas Petri para inocularse por medio de estría. Incubar 24 – 72h/ 27° C hasta observación de crecimiento.
5. Se prepararon y vaciaron en los medios YPG modificado con la adición de tritón x100 al 0.1%, se realizó la resiembra. Incubar 24 – 72h/ 27° C hasta observación de crecimiento.

5.1 Se realizó la identificación morfológica de cada cepa en estudio.

6. Se prepararon y vaciaron en medio YPG líquido en matraces Erlenmeyer y se inocularon las cepas por resuspensión. Hasta la inducción de micelio total.

#### 8.5 Extracción de ácidos nucleicos (Figura 6)

1. Se colocó en un tubo eppendorf 200  $\mu$ L de solución de PBS y agregaron de 50 a 100 mg de micelio para suspensión de la muestra.
2. Una vez resuspendido el micelio transferirlo a un tubo de lisis Zr bashingbead para la extracción de ácidos nucleicos, se agregaron 750  $\mu$ l de sol. para lisis

(Lysis Solution), y se llevó a vortex (vel. Máxima lapsos de 1 min a 40 seg hasta sumatoria de 5 min).

3. Se llevó a microcentrifuga a 10,000 rpm por un lapso de 1 min.

4. Se transfirió al tubo Zymo - Spin VI Spin Filter, 400  $\mu$ L del sobrenadante obtenido del tubo anterior, y se llevó a microcentrifuga a 7,000 rpm por un lapso de 1min.

5. Se agregaron 1,200  $\mu$ L de buffer de DNA Fungi/Bacterial para precipitación y se mezcló suavemente.

6. En un tubo con filtro (Zimo - Spin IIC colum) se procedió a transferir 800  $\mu$ L del paso 5, y se llevó a microcentrifuga a 10,000 rpm por un lapso de 1 min., procediendo a descartar el sobrenadante y repitiendo este paso. .

7. En un tubo colector se procedió a colocar solo la columna, del tubo utilizado en el punto 6, posteriormente se agregaron 200  $\mu$ L buffer de pre lavado (DNA Pre - Wash Buffer) y se llevó a microcentrifuga a 10,000 rpm por un lapso de 1 min.

8. Se agregaron 1200 $\mu$ L del buffer de DNA Fungal/bacterial y se filtró en tubo colector.

9. Se agregaron 500  $\mu$ L buffer de lavado (Fungal/Bacterial DNA Wash Buffer), y se llevó a microcentrifuga a 10,000 rpm por lapso de 1 min.

10. Se transfirió solo la columna de paso 9 a un tubo eppendorf y se agregaron 63  $\mu$ L del buffer de elución el cual sirvió para la recuperación de ácidos nucleicos (DNA Elution Buffer), llevándose a microcentrifuga a 10,000 rpm por 30 segundos.

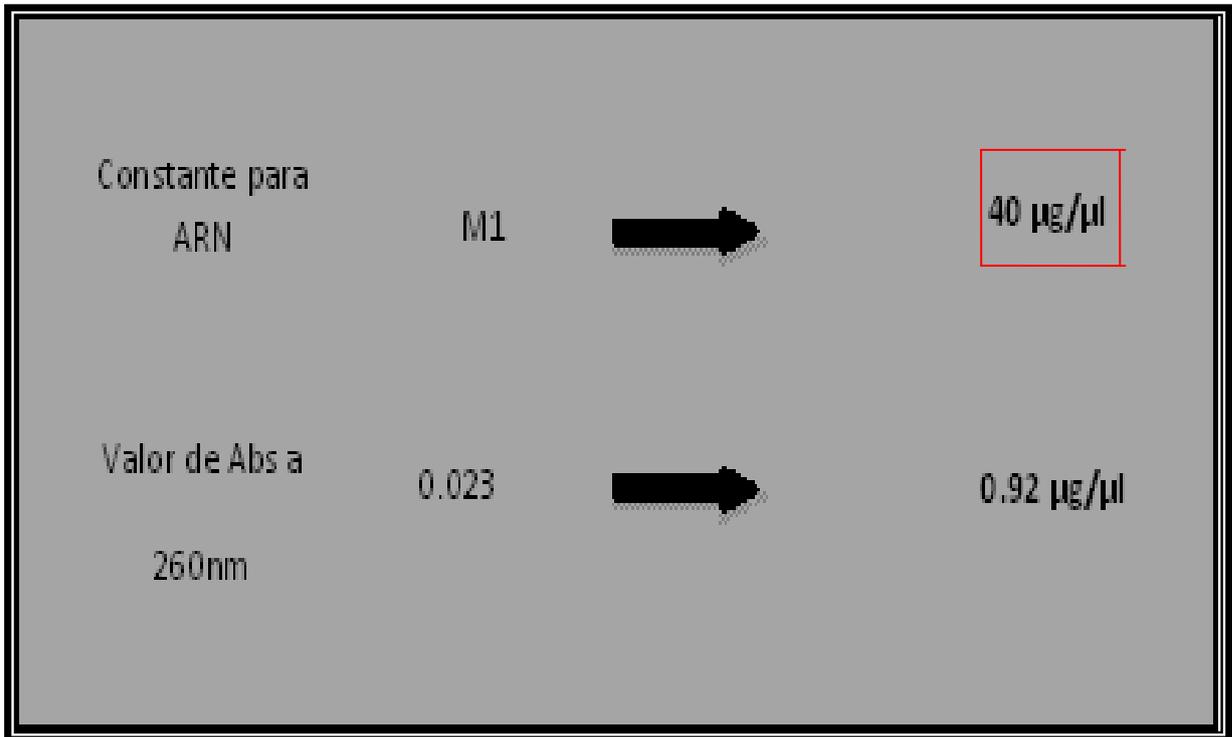
### 8.6. Determinación de la concentración de ácidos nucleicos.

Para realizar los cálculos, se utilizaron los datos que fueron recolectados del proceso de espectrofotometría, al cual fueron expuestas las muestras purificadas de sus correspondientes ácidos nucleicos, de aquí se procedió con la siguiente metodología:

A). Se planteó la constante a utilizar sabiendo que:

**Ácido ribonucleico ARN (1  $\longrightarrow$  40  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ).**

B). Se realizó una regla de tres utilizando el valor de Absorbancia (Abs) 260nm ya que este es el referente a la concentración de cadena de ARNm (**Figura 7**).



**Figura 7.** Ejemplificación para la obtención de la concentración de ARNm. Valores tomados para la obtención de la concentración de 0.92 µg/µl para la muestra 1, las concentraciones obtenidas de ARNm se muestran en la **Tabla 9** del apartado correspondiente a resultados.



**Figura 8.** (A) Proceso de Electroforesis (B) Ensamble de electrodos (C) Generador de corriente.

## 8.7 Amplificación mediada por la Taq polimerasa (PCR)

### 8.7.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Los aislamientos de los fitopatógenos fueron identificados mediante el uso de marcadores moleculares de 100 pb. Todas las muestras ADN fueron amplificadas por duplicado. Las reacciones de PCR fueron realizadas en un termociclador con gradiente Mastercycler (Eppendorf AG, Hamburg Germany).

El programa de amplificación en el Termociclador fue el siguiente:

95°C 5 min (temperatura de activación).

95°C 50 seg; 65°C 1 min (temperatura de alineamiento).

71°C 1 min y una extensión de 8 min a 72°C durante 40 ciclos.

## 8.8 Electroforesis

1. Se elaboró de gel de agarosa.
2. Se agregó el buffer TAE 1x hasta cubrir gel dentro de la cámara.
3. Se colocó en los canales del gel las muestras previamente preparadas (aprox. 2 µl de buffer de carga + 8 µl de muestra de ADN) así como un marcador de peso molecular para la identificación de bases. (**Figura 8-A**).
4. Se cerró perfectamente la cámara, y se ensamblaron los electrodos. (**Figura 8-B**).
5. Se corrió el proceso de electroforesis con el generador de corriente a 90volt's: 80 miliamperes: ±110 min. (**Figura 8-C**).
6. Se observaron los resultados sobre luz ultravioleta.
7. Finalmente se obtuvieron las fotografías para evidenciar resultados.

## IX. RESULTADOS.

### 9.1 Ubicación geográfica

La ubicación geográfica de los puntos de muestreo se realizó utilizando el sistema de geoposicionamiento global (GPS) y el tipo de microorganismo aislado. En las determinaciones de la **Tabla 7** se tienen 9 puntos de muestreo en los que la temperatura para los puntos geográficos 7, 8 y 9 se mantienen en torno a los 17.5°C sin variación significativa lo que permite tener una concordancia con una posible baja carga microbiana en donde el indicador microbiano es *Fusarium sp.* En estos puntos (7,8 y 9) localizados a una altitud sobre el nivel del mar de los 1434 a 1460 msnm, los asentamientos humanos son escasos y recientes los cultivos de frutillas y es un lugar donde se tiene una afluyente natural del agua pero en el cual existen algunos asentamientos humanos, los que pueden ejercer un efecto en la carga microbiana.

Respecto a los puntos del 6 al 1 se obtiene un sentido descendente de los 1349 a los 1290 msnm, es donde se encuentran los cultivos más viejos que datan de 1994 a la fecha que se usaron para el cultivo de caña de azúcar, es donde se encuentra la mayor densidad poblacional humana actual en el valle de los Reyes esto está en concordancia con el hallazgo de *Colletotrichum sp.* El cual es un organismo que tolera temperaturas relativamente elevadas como las que se muestran en la presente tabla para los puntos 6 al 1. (Cabral, 2010). Obsérvese **Tabla 7**.

**Tabla 7.** Resultados del muestreo por medio del GPS.

Puntos de muestreo	Latitud	Longitud	Altitud/ msnm	Temperatura °C	Microorganismo Aislados
1	19.36941°	102.38680°	1290	22.0	<i>Colletotrichum</i>
2	19.36924°	102.28692°	1295	20.5	<i>Colletotrichum</i>
3	19.36906°	102.28680°	1296	22.0	<i>Colletotrichum</i>
4	19.35429°	102.29149°	1303	21.5	<i>Colletotrichum</i>
5	19.35234°	102.28312°	1327	22.5	<i>Colletotrichum</i>
6	19.35003°	102.27490°	1349	21.5	<i>Colletotrichum</i>
7	19.34816°	102.25818°	1434	17.5	<i>Fusarium</i>
8	19.34809°	102.25819°	1437	17.5	<i>Fusarium</i>
9	19.34763°	102.25758°	1460	17.5	<i>Fusarium</i>

## 9.2 Toma de muestra

Durante los meses de julio y agosto del año 2011, se realizó muestreo en los 9 puntos descritos en la **Figura 9**, que abarcan los sembradíos de *Rubus Fruticosus* presentes en el municipio de los Reyes Michoacán, Méx., colectando follaje, tallo principal, suelo arcilloso y frutos de *Rubus fruticosus*, con síntomas de manchas y pudriciones, cada muestra fue colocada en un tubo rotulado y almacenado en un contenedor de unicel para evitar altas temperaturas durante su traslado.

## 9.3 Procesamiento de la muestra

De cada muestra se tomaron trozos de tejido de la zona de avance de la enfermedad, se desinfectaron con agua destilada estéril. Se hicieron siembras de tejido en cajas de Petri en los medios de cultivo APD, YPG (sólido y líquido) y nutritivo. Obsérvese **Figura 10**.

El sembrado se realizó por triplicado para cada una de las muestras de los 9 puntos descritos. Se obtuvieron cepas más definidas y aisladas gracias a la adición de Tritón x-100 tal como se observa en la **Figura 11**.

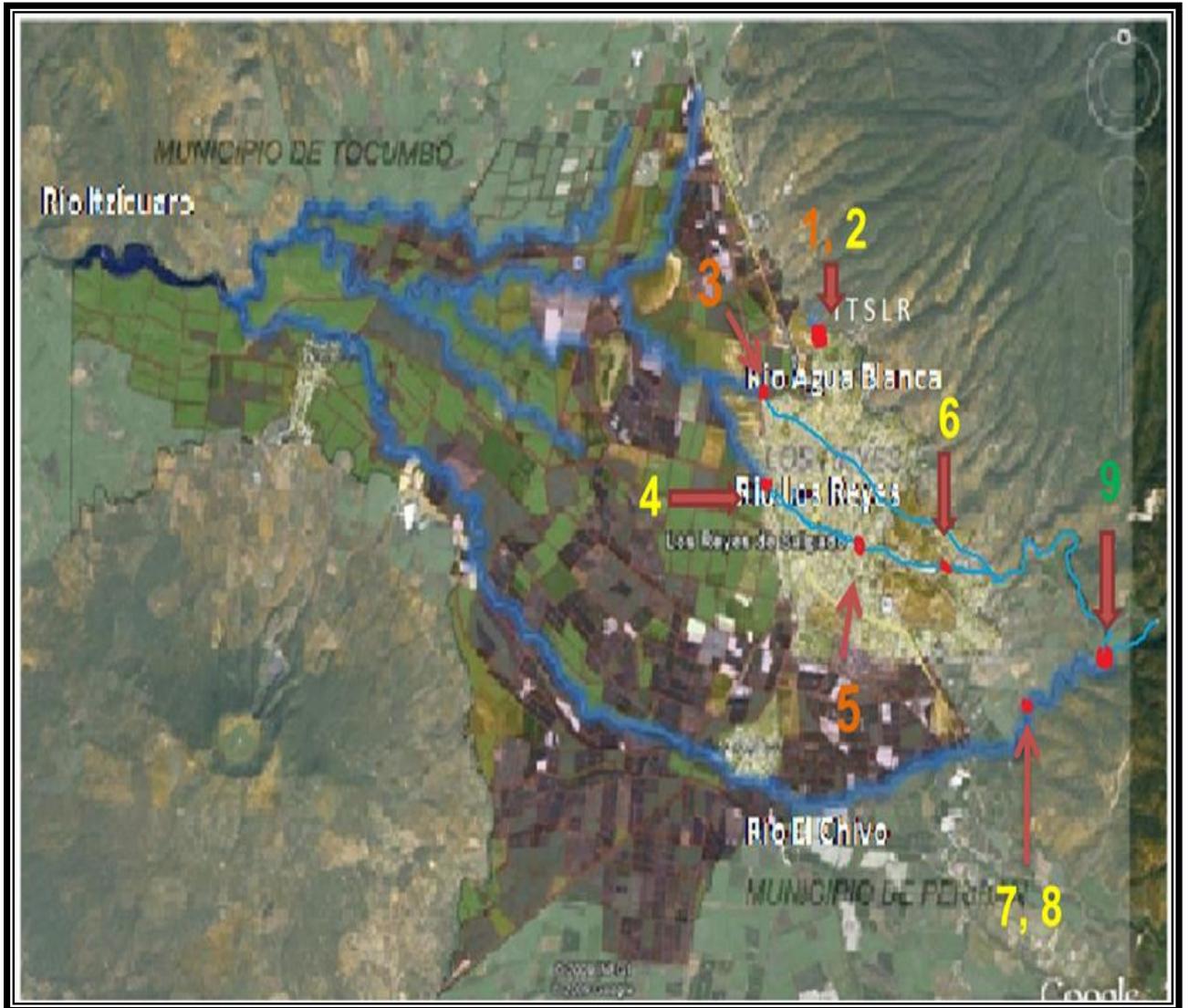
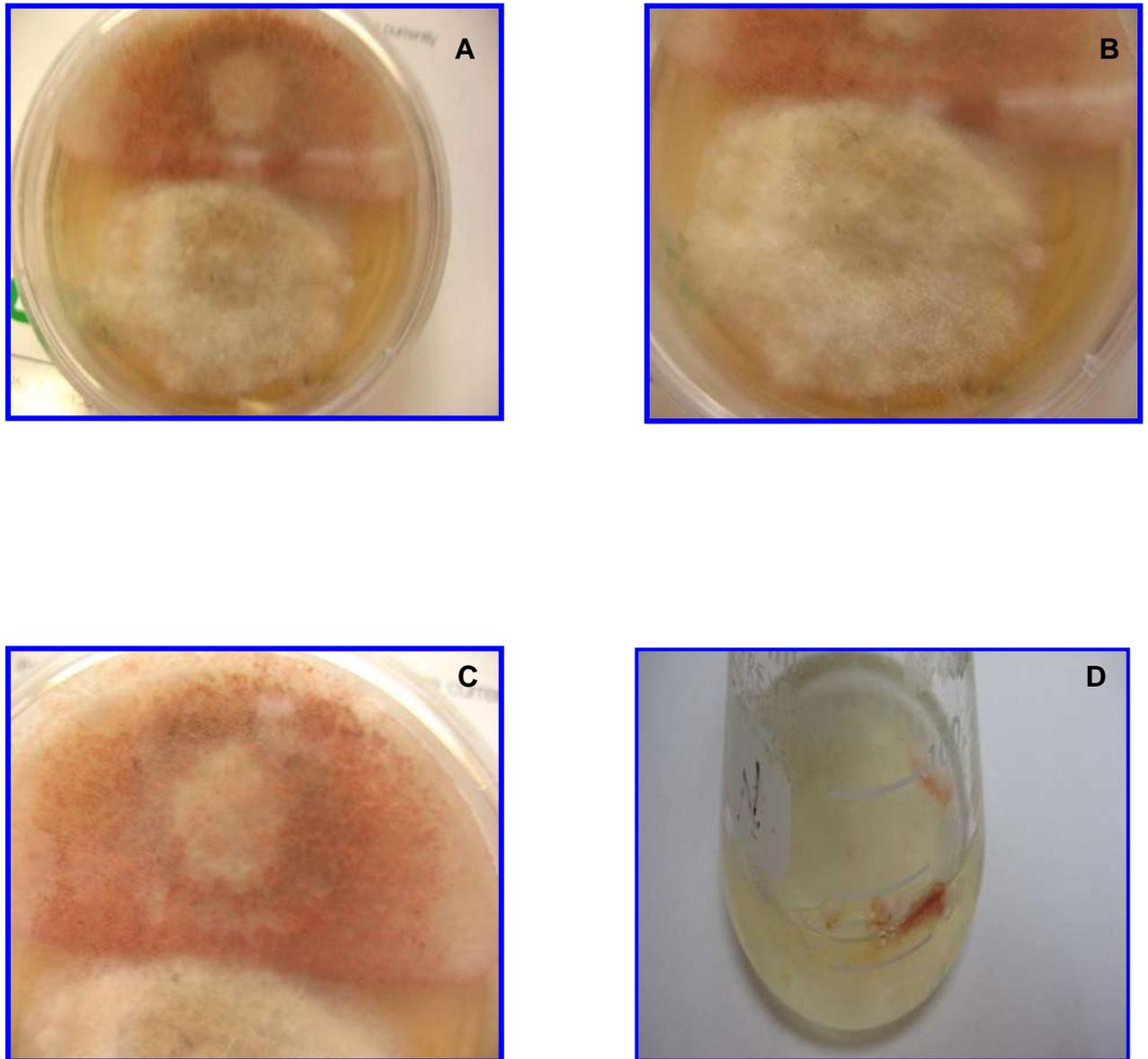
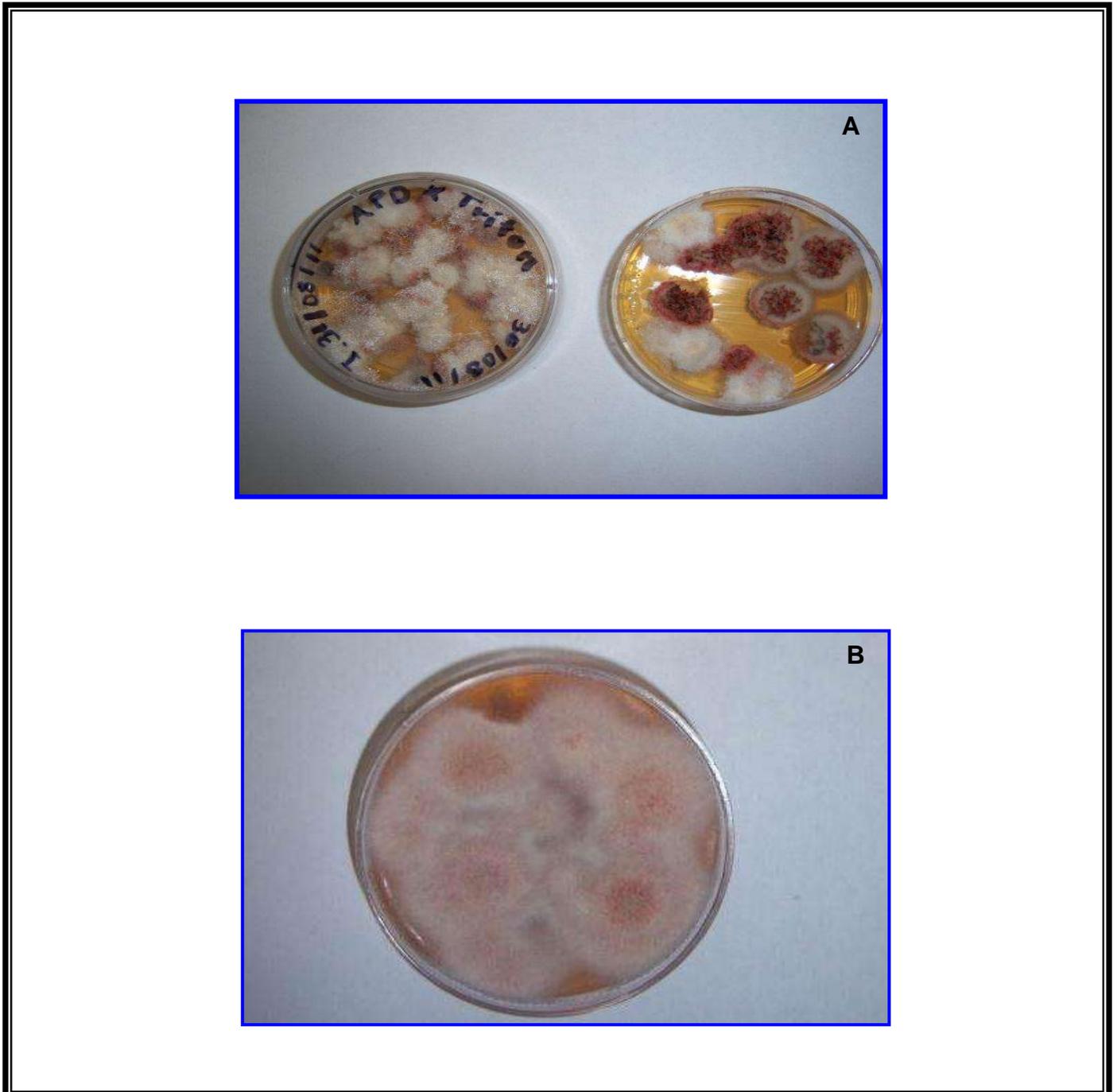


Figura 9. Georeferencia de los nueve puntos de muestreo, en los Reyes, Michoacán.



**Figura 10.** (A) Medio de cultivo YPG sólido, obsérvense colonias aisladas (B) Medio de cultivo YPG sólido inoculado con el microorganismo causal *Colletotrichum sp.* (C) Medio de cultivo YPG sólido inoculado con el microorganismo causal *Fusarium sp.* (D) Medio de cultivo YPG líquido inoculado con el microorganismo causal *Fusarium sp.*



**Figura 11.** (A) Medio de cultivo YPG más el reactivo *tritón x 100*, obsérvense colonias aisladas al impedir el crecimiento radial (B) Medio de cultivo YPG inoculado con el microorganismo causal.

#### 9.4 Identificación de hongos fitopatógenos

En el LAACA (Laboratorio De Análisis De Aseguramiento De La Calidad Del Agua) de la Facultad de Químico Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo se identificaron dos tipos de crecimiento de hongo. El primero en los puntos de muestreo del 1 al 6 presentó crecimiento rápido, micelio blanquecino abundante algodonoso este tipo de crecimiento coinciden con uno de los descritos por (Álvarez, *et al.*, 2002) en estudio sobre la infección de *Colletotrichum gloeosporoides* en guanábana en el Valle del Cauca. El segundo en los puntos de muestreo del 7 al 9 presentó crecimiento rápido micelio color salmón, con pigmentación al reverso. Las diferencias morfológicas entre los dos tipos de colonias observados sugieren la presencia de dos fitopatógenos *Fusarium oxysporum* y *Colletotrichum gloeosporoides*. Obsérvese la **Figura 10** y **Tabla 8**.

Posteriormente a través de medios de cultivo líquido YPG se indujo la formación de micelio total (vegetativo/aéreo) proveniente de los microorganismos aislados.

<b>Tabla 8. Características morfológicas</b>				
<b>A) Descripción Macroscópica</b>				
Fitopatógeno	Pigmento		Presencia De Micelio	Textura/Crecimiento
	Anverso	Reverso		
<i>Colletotrichum gloeosporoides</i>	Blanco/grisáceo al centro	Blanquecino	Si	Algodonosa abundante/relieve Irregular/Rápido
<i>Fusarium oxysporum</i>	Salmon	Rosado durazno	Si	Algodonoso/Rápido
<b>B) Descripción Microscópica</b>				
Fitopatógeno	Características De Los Conidios		Características De Las Hifas	
<i>Colletotrichum gloeosporoides</i>	De ovalados a curvos, conidióforos rectos y cortos		Hialina, generativas septadas	
<i>Fusarium oxysporum</i>	Microconidias sin tabique y macroconidias falciformes, tabicadas y con célula pie		Hialina, septadas, ramificadas tabicadas	

### **9.5 Cuantificación de ácidos nucleicos mediante espectrofotometría.**

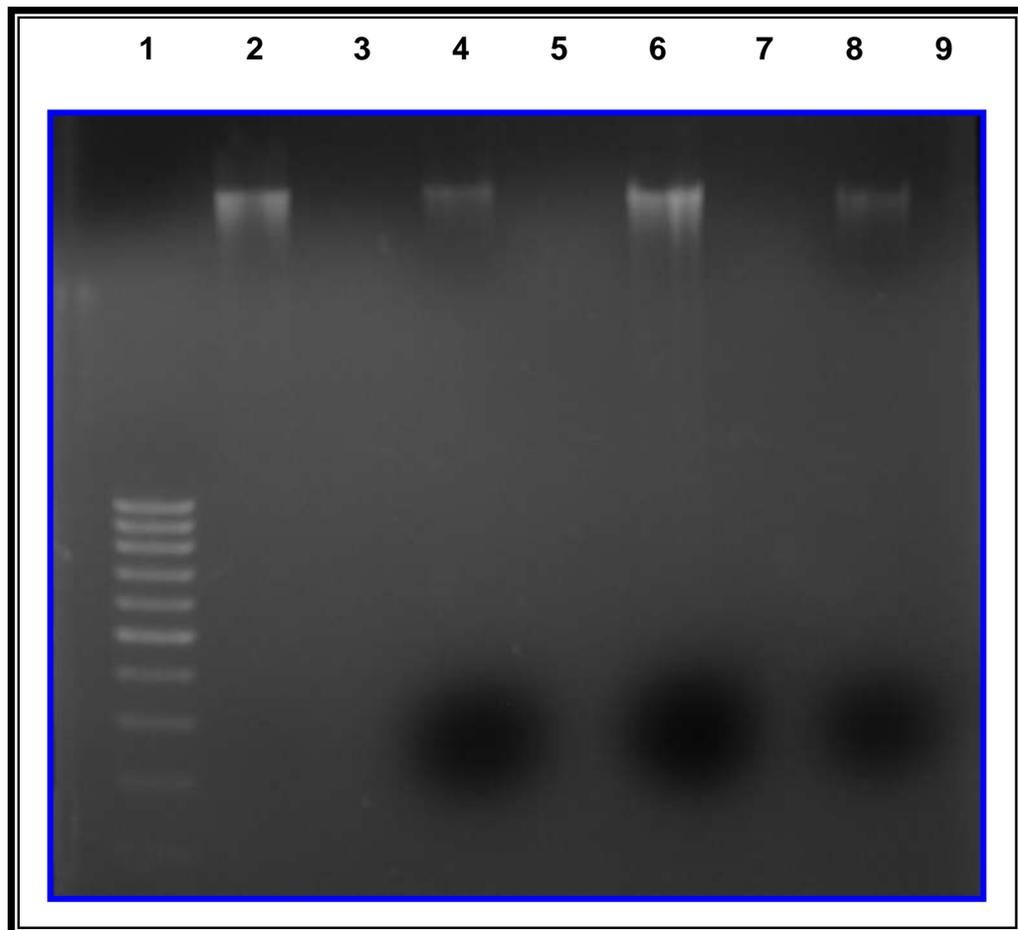
Se realizó la extracción de ácidos nucleicos obteniéndose como se explicó en la metodología y utilizando el equipo de nueva generación ZYMO RESEACH mostrado en la **figura 6**, posterior a la extracción se utilizó el espectrofotómetro y se realizaron las lecturas a absorbancias de 260 y 280nm, obteniéndose concentraciones positivas de ácidos nucleicos para las tres muestras analizadas. Los ácidos nucleicos como el ARN absorben longitudes de luz ultravioleta a los 260nm que es lo que se observa en la columna correspondiente y los procesos de extracción actual siempre conllevan cierto grado de impurezas generalmente proteínas las cuales absorben luz a la longitud de 280nm observado en la columna respectiva; Por lo tanto se ha establecido un coeficiente de calidad del material genético aislado en este caso es la proporción del valor obtenido en la longitud de 260nm entre el valor de la longitud observada a 280nm lo cual permite establecer la concentración de ARN en microgramos sobre microlitro ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) en la columna correspondiente a la **tabla 9**.

**Tabla 9.** Concentración obtenida de ácidos nucleicos.

Concentración obtenida de ácidos nucleicos.				
Muestra.	Abs 260nm.	Abs 280nm.	Coefficiente de relación (260nm/280nm).	Concentración del ARNm.
1	0.023	0.012	1.91	0.92 µg/µl
2	0.011	0.007	1.57	0.44 µg/µl
3	0.018	0.013	1.38	0.72 µg/µl

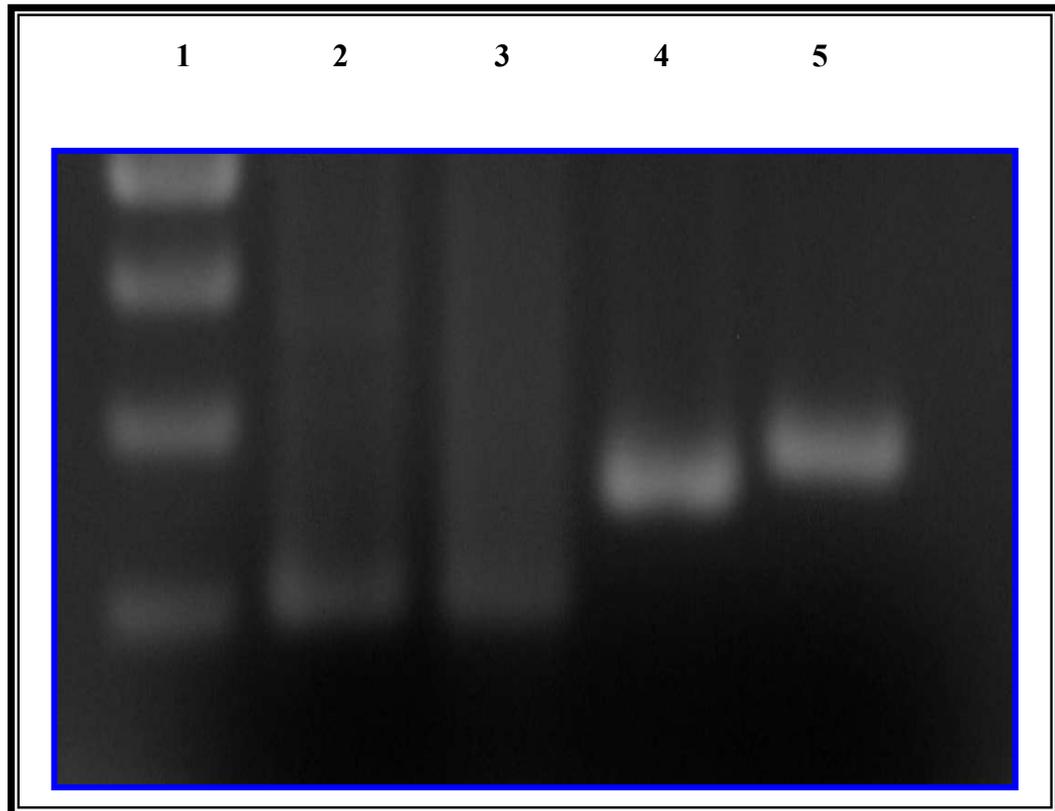
### 9.6 Identificación *Colletotrichum sp.* y *Fusarium sp.* por PCR.

Dentro del protocolo de identificación de las especies de fitopatógenos (*Colletotrichum sp.* y *Fusarium sp.*) es necesario poder observar en un gel de integridad la cantidad y calidad del ARN obtenido de cada una de las cepas que se aislaron y se extrajo el material genético correspondiente. En la **figura 12** se visualiza en el carril número uno el marcador de 100 pares de bases, el cual sirve de referencia para poder ubicar fragmentos mayores a 1000 pares de bases. En los carriles 2, 4, 6 y 8 se observa material genético íntegro y específico para cada una de las cepas aisladas, adicionalmente se ve que este material no está degradado puesto que se observa una sola banda mayor a 1000 pares de bases. Respecto a los carriles 3, 5, 7 y 9 corresponde a controles negativos en los cuales no se observa material genético alguno por lo que el establecimiento de los controles negativos es vital para asegurar que los resultados obtenidos posteriormente en la RT-PCR corresponderán a productos de amplificación específicos teniendo como matriz únicamente al ARN de los carriles 2, 4, 6 y 8 respectivamente. Obsérvese **Figura 12**.



**Figura 12.** Gel de Integridad del material genético (ADN) proveniente de las muestras aisladas de los fitopatógenos fúngicos. Carriles: 1.- Marcador molecular de 100 pb. 2.- ADN de aislado 1 de *Colletotrichum sp.*, 3.- Control negativo, 4.- ADN de aislado 2 de *Colletotrichum sp.*, 5.- Control negativo, 6.- ADN de aislado 1 de *Fusarium sp.*, 7.- Control Negativo, 8.- ADN de aislado 2 de *Fusarium sp.*

Para corroborar la identidad de las cepas aisladas *Fusarium sp.* y *Colletotrichum sp.* se realizaron las transcripciones inversas seguidas de una reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) a partir de cada uno de los templados del material ARNm aislados para cada cepa proveniente de los diferentes puntos de muestreo. Obteniendo fragmentos únicos y específicos para cada uno de los materiales genéticos aislados; Lo cual nos permite concluir que para cada cepa las condiciones de la RT-PCR y la especificidad de los oligonucleótidos es la adecuada, ver **Figura 13**.



**Figura 13.** Correspondiente a la PCR de los agentes fitopatógenos: 1) Marcador de tamaños moleculares en pares de bases (100pb), 2) cepa C1 *Colletotrichum gloeosporioides* (210pb), 3) cepa C2 *Colletotrichum gloeosporioides* (210pb), 4) cepa F1 *Fusarium oxysporum* (260pb), 5) cepa F2 *Fusarium oxysporum* (260pb).

## X. DISCUSIÓN

La derrama económica y el número de puestos labores (hasta 60 000 en la temporada de producción, de octubre a junio en 2011) ha convertido a los cultivos de las denominadas frutillas rojas en su conjunto, en donde predomina el cultivo de la zarzamora (*Rubus fruticosus*), arándanos (*Vaccinium myrtillus*) en una de las agroindustrias a nivel nacional principales, por su liderazgo en producción y comercialización a nivel de exportación hacia empresas como Sunbelle, Driscoll por ejemplo, con presencia en Estados Unidos y Europa en donde los municipios de la región del Valle de los Reyes Michoacán (Peribán, Tocumbo y los Reyes) son los que presentan la mayor superficie con zarzamoras cultivadas. Por lo que los cambios climáticos, el uso de técnicas de agricultura de manera extensiva, en donde se utilizan compuesto químicos como organofosforados, organoclorados (pesticidas), así como el uso indiscriminado y no controlado de compuestos antifúngicos como el oxiclورو de cobre, tiabendazol por mencionar los más utilizados en esta región agrícola de Michoacán. La poca investigación científica y la falta de información sistematizada no han permitido entender la problemática en cuanto a la prevalencia e identificación correcta de fitopatógenos de tipo fúngico permitiendo de esta manera la prevalencia y germinación de especies de hongos fitopatógenos (Grainge y Ahmed, 1988, Stauffer, et al., 2000). Entre los que se han encontrado e identificado cepas del genero *Fusarium oxysporum* así como *Colletotrichum gloeosporioides*, reportados en presente trabajo.

Así de esta manera en el presente trabajo se establecen condiciones que permiten describir el protocolo de aislamiento e identificación de hongos fitopatógenos en este tipo de cultivos los cuales son relativamente recientes en la región de los Reyes, por lo que el ecosistema puede verse alterado al ser colonizados (los frutos del cultivo *Rubus fruticosus* y *Vaccinium myrtillus*) esto debido al control deficiente por parte de productores y asesores técnicos de estos cultivos, de organismos fitopatógenos habitantes del suelo, es por tanto difícil de lograr su erradicación por lo que su identificación y caracterización, incluso tiene un costo elevado en la producción debido a que implica el desarrollo y en el mejor de los casos la rotación de nuevos pesticidas y/o antifúngicos (Zavaleta, 1987), esto de una manera empírica.

Debido a lo anterior es prioritario la búsqueda sistemática de alternativas en la identificación y por lo tanto en el manejo de enfermedades con etiología fúngica que permitan reducir los costos en los insumos agrícolas tales como fertilizantes, plaguicidas y antifúngicos lo cual permite, reducir los costos de producción en forma significativa así como reducir los severos problemas de contaminación ambiental, asegurar la inocuidad y competitividad de estos alimentos con los consecuentes beneficios a la salud humana (Montes-Belmont, 1996). La identificación del género *Fusarium sp.* y *Colletotrichum sp.* en estos cultivos de importancia económica, permitirá caracterizar de una mejor manera el comportamiento de estas especies frente antifúngicos de utilización indiscriminada logrando posteriormente un mejor control en los cultivos que dentro de la región se desean explotar en invernadero y pueden suponer retos diferentes. El poner a punto estrategias de identificación molecular en la práctica de campo permite demostrar la presencia de cepas del genero *Fusarium sp.* y *Colletotrichum sp.*, aunque es necesario ampliar el estudio a otros organismos fúngicos *Neurospora sp.*, *Verticillium sp.*, los cuales han sido reportados por grupos de asesores técnicos en la región, lo cual no queda descartado, más sin embargo, en el presente estudio no se identificaron por lo que queda pendiente de comprobar o refutar esto que mencionan los técnicos en campo.

Adicionalmente la utilización de herramientas informáticas y de geoposicionamiento global (GPS) en zonas específicas de cultivo y de muestreo de las frutillas rojas de las especies comerciales afectadas por especies de fitopatógenos en una superficie representativa de 40 hectáreas y con fluctuaciones de la altitud sobre el nivel del mar de los 1290 a los 1470 msnm. que es donde se concentra el cultivo de especies del género *Rubus fruticosus* y *Vaccinium myrtillus* que permiten la generación de datos originales que apoyen la caracterización de los fitopatógenos locales asociados a la producción y de esta manera se generan mapas de prevalencia y control de huertas (zonas) con el riesgo potencial de fitopatógenos, combinando herramientas moleculares, informáticas y la exactitud y precisión del georeferenciamiento.

## XI. CONCLUSIONES

Este es uno de los primeros trabajos que abordan de manera sistematizada el aislamiento, identificación de cepas de los hongos fitopatógenos *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium oxysporum*, a través de un protocolo de biología molecular (extracción y RT-PCR) aplicado al campo y la conjunción de herramientas informáticas que generan un mapa de riesgos de fitopatógenos para la región productora de frutillas rojas (*Rubus fruticosus* y *Vaccinium myrtillus*) y de esta manera aumentar la calidad y asegurar la inocuidad de los productos.

## XII. PERSPECTIVAS.

Se propone ampliar el área de estudio de la región de los Reyes de Salgado Michoacán (Tocumbo, Peribán y los Reyes), así como incluir los municipios también productores de frutillas rojas como el municipio de Ziracuaretiro y Taretán. Particularmente la tenencia de Patuan.

Realizar un banco de datos que pueda relacionar el origen (geoposicionamiento) de la muestra biológica aislada y la especie de microorganismo fúngico y generar un mapa con las características de especies fúngicas de fitopatógenos y los datos de geoposicionamiento, el cual puede consultarse en plataformas informáticas comerciales, a través de la red de internet mundial.

Adicionalmente se considera utilizar la reacción en cadena de la polimerasa en forma cuantitativa, lo que permitirá poder utilizar este tipo de protocolos para la cuantificación de esporas de organismos fúngicos viables en muestras de suelo, agua, hojas y restos vegetales que puedan servir de reservorios para las esporas latentes.

### XIII. GLOSARIO

**Absorbancia:** Medida de la atenuación de una radiación al atravesar una sustancia, que se expresa como el logaritmo de la relación entre la intensidad saliente y la entrante.

**Acérvulo:** Grupo de conidios que se une de modo directo al micelio subyacente.

**Acido Desoxirribonucleico (ADN):** molécula de longitud gigantesca, que está formada por agregación de tres tipos de sustancias: azúcares, llamados desoxirribosas, el ácido fosfórico, y bases nitrogenadas de cuatro tipos, la adenina, la guanina, la tiamina y la citosina.

**Ácido Ribonucleico (ARN):** es un ácido nucleico formado por una cadena de ribonucleótidos. Está presente tanto en las células procariotas como en las eucariotas, y es el único material genético de ciertos virus (virus ARN). El ARN celular es lineal y de hebra sencilla, pero en el genoma de algunos virus es de doble hebra.

**Ácidos nucleicos:** macromoléculas, polímeros formados por la repetición de monómeros llamados nucleótidos, unidos mediante enlaces fosfodiéster. Se forman, así, largas cadenas o polinucleótidos, lo que hace que algunas de estas moléculas lleguen a alcanzar tamaños gigantes (de millones de nucleótidos de largo).

**Antracnosis:** síntoma de enfermedad que presentan muchas plantas. Se caracteriza por la presencia de manchas de diferentes colores que pueden afectar las hojas, los frutos, los vástagos o las yemas. Estas manchas generalmente van creciendo y produciendo la defoliación de las ramas, y la muerte o la sequía de los frutos afectados. Otras veces la parte manchada se desprende de la hoja y deja agujero o pedazos vacíos de la misma.

**Biomolécula:** compuesto químico que se encuentra en los organismos vivos. Están formadas por sustancias químicas compuestas principalmente por carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, sulfuro y fósforo. Las biomoléculas son el fundamento de la vida y cumplen funciones imprescindibles para los organismos vivos.

**Buffer:** sistema formado por un ácido débil y su base conjugada (o viceversa) que se opone a las grandes variaciones del pH en una disolución acuosa.

**Carcinogenicidad:** capacidad de una sustancia para inducir neoplasmas malignos, es decir, cáncer.

**Conidio:** (conidium). Espora externa asexual, se forma en las hifas o en el conidióforo

**Conidióforo:** Hifa reproductora especializada que produce esporas o conidios.

**Cultivo axénico:** es aquel que contiene un único tipo de microorganismos.

**Electrodo:** Extremo de un conductor en contacto con un medio, al que lleva o del que recibe una corriente eléctrica.

**Electroforesis:** método de laboratorio en el que se utiliza una corriente eléctrica controlada con la finalidad de separar biomoléculas según su tamaño y carga eléctrica a través de una matriz gelatinosa.

**Esclerocio:** es una masa compacta de micelio endurecido que contiene reservas alimenticias, el papel de los esclerocios es sobrevivir en periodos ambientales extremos. En algunos hongos superiores, los esclerocios se desprenden y permanecen en dormancia hasta que se den las condiciones favorables para el desarrollo de un nuevo micelio.

**Espectrofotometría :** método de análisis óptico utilizado en investigaciones biológicas, en la cual se utiliza el espectrofotómetro que es un instrumento que permite comparar la radiación absorbida o transmitida por una solución que contiene una cantidad desconocida de soluto, y una que contiene una cantidad conocida de la misma sustancia.

**Esterilización:** es el proceso de eliminación de toda forma de vida, incluidas las esporas. Es un término absoluto que implica pérdida de la viabilidad o eliminación de todos los microorganismos contenidos en un objeto o sustancia, acondicionado de tal modo que impida su posterior contaminación.

**Fitopatógeno:** en Fitopatología se denomina fitopatógeno a un organismo, en general microorganismo, que causa enfermedades en las plantas por medio de disturbios en el metabolismo celular causado por la secreción de enzimas, toxinas, fitoreguladores y otras sustancias y, además, por la absorción de nutrientes de la célula para su propio crecimiento. Algunos fitopatógenos pueden causar también enfermedades por crecer y multiplicarse en el xilema y en el floema de la planta y, por ende, por bloquear el transporte de agua y nutrientes desde la raíz hacia las hojas o el flujo de savia desde las hojas hacia el resto de la planta.

**Híbrido(a):** animal o vegetal que proviene de dos especies o variedades distintas por fecundación o copulación entre ellas.

**Hialino:** Sin color, no pigmentado.

**Hifa:** Filamentos de un hongo, muchas constituyen un micelio.

**Hot Start Taq polymerase:** grupo enzimático con función de polimerización de nucleótidos los cuales para ser activados requieren de la elevación de la temperatura que generalmente ronda los 90 a 95 °C.

**Huésped:** organismo a cuya costa vive un organismo parásito

**Inhibición:** efecto que produce sobre el funcionamiento de un órgano, tejido o principio activo cualquier agente físico, químico, nervioso, etc., y que se manifiesta en una detención total o parcial de dicha función.

**Medio de cultivo:** es un material que se usa en el laboratorio para el desarrollo de los microorganismos. Una vez que ha sido preparado, un medio de cultivo puede ser inoculado (es decir, se le añaden organismos) y a continuación incubado en condiciones que favorezcan el crecimiento microbiano.

**Morfología:** en términos generales cuando hablamos de morfología se está refiriendo al estudio de las formas externas de un objeto de estudio.

**Mutagenidad:** capacidad de un agente biológico, químico o físico para inducir cambios heredables (mutaciones).

**Narcosis:** estado parecido al sueño profundo producido artificialmente por medio de productos químicos en el cual se pierde la consciencia y la sensibilidad al dolor.

**Nucleótido:** moléculas que se pueden presentar libres en la Naturaleza o polimerizadas, formando ácidos nucleicos. También pueden formar parte de otras moléculas que no son ácidos nucleicos, como moléculas portadoras de energía o coenzimas. Los nucleótidos se forman por la unión de una base nitrogenada, una pentosa y uno o más ácidos fosfóricos. La unión de una pentosa y una base nitrogenada origina un nucleósido, y su enlace se llama N - glucosídico.

**Onicomycosis:** Micosis de las uñas.

**Patogenicidad:** capacidad de un agente infeccioso de producir enfermedad en un huésped susceptible.

**PCR:** técnica de biología molecular cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, basta a partir de una única copia de ese fragmento original, o molde, lo que se conoce como amplificación.

**Primers:** oligonucleótido sintético de unos 15-20 nucleótidos complementarios a la zona flanqueante de la región que se quiere amplificar, estos actúan como cebadores para la síntesis de ADN in vitro, la cual está catalizada por la Taq polimerasa, los primers actúan como marcadores del sitio de inicio de la enzima.

**Queratitis:** Inflamación de la córnea.

**Queratomycosis:** son infecciones de la córnea del ojo causadas por hongos. Son generalmente confundidos por infecciones bacterianas por lo que es común que la infección llegue al oftalmólogo en mal estado, poniendo en muy alto el riesgo de perder el ojo.

**Reservorio:** organismo que alberga un agente infeccioso (virus, bacteria, parásito, hongo) de una enfermedad, sin tener la enfermedad.

**Secuencia génica:** es una sucesión de bases nitrogenadas (A, G, C, T) representando la estructura primaria de una molécula real o hipotética de ADN o banda de ampliación, con la capacidad informacional.

**Seta:** Cualquier especie de hongo, comestible o no, con forma de sombrilla, sostenida por un pedicelo.

**Taq polimerasa:** enzima aislada de una bacteria (*Termophilus acuaticus*), que es capaz de incorporar nucleótidos libres en el extremo 3' del primer unido a la cadena principal ; formando así una cadena complementaria, la enzima tiene la característica de soportar temperaturas elevadas y mantener una media de extensión de 60 nucleótidos por segundo en regiones ricas en uniones G-C.

#### XIV. BIBLIOGRAFÍA

- Abang M. M., Winter S., Mignouna H. D., Green K. R., Asiedu R. Molecular Taxonomic, Epidemiological and Population Genetic Approaches to Understanding Yam Anthracnose Disease. *Afr J Biotechnol.* 2003; 2:486-496.
- Afanador-Kafuri, L., D. Minz, M. Maymom and S. Freeman. 2003. Characterization of *Colletotrichum* isolates from tamarillo, passiflora, and mango in Colombia and identification of a unique species from the genus. *Phytopathology*
- Agrios G. 2001 *Plant Pathology* 4 Ed., Academic Press, San Diego, USA
- Alconada T.M., Martinez M.J. 1995. Isolation protoplasts from vegetable tissue using extracellular lytic enzymes from *Fusarium oxysporum* f. sp. *Rev Argent Microbiol.*; 27:191-7.
- Alves-Santos, F. M.; Benito, E. P.; Eslava, A. P. and Díaz-Mínguez, J. M. 1999. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* strains from common bean fields in Spain. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3335-3340.
- Avilan, L., F. Leal y D. Batista, 1992. Manual de fruticultura: Principios y manejo de la producción. Editorial America. 2da Edición (II Tomos) Caracas, Venezuela.
- Bartnicki-Garcia S., Nickerson W.J. 1962. Nutrition, growth, and morphogenesis of *Mucor rouxii*.
- Benhamou N., Chamberland H., Pauze F.J. 1990. Implication of pectic components in cells surface interactions between tomato root cell and *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Plant Physiol.*; 92: 995-1003.
- Brandán de Antoni, E. Z.; González, A. G.; del Carmen Seco, E. 2009. Tomate destinado a la industria. Universidad Nacional de Catamarca, Facultad de Ciencias Agrarias, Cátedra de Horticultura y Economía Agraria. Página/s: 35. ISBN: 978 - 987 - 1341 - 77 - 1. URL [http://www.editorial.unca.edu.ar/Publicacione/Brandan\\_Gonzalez.pdf](http://www.editorial.unca.edu.ar/Publicacione/Brandan_Gonzalez.pdf). Fecha de consulta: 30/11/2010. Hospedero: Tomate.
- Burger, de 1921. . Las variaciones en *Colletotrichum gloeosporioides*. *J. Agric. Res.* 20:723-735.
- CabralJP. (2010). Water microbiology, Bacterial pathogens and wáter, *IntJEnvironRes PublicHealth.* 7(10):3657-703.

- Canteros, B. I. 2009. Guía para la identificación y el manejo de las enfermedades fúngicas y bacterianas de citrus. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA); Provincia de Corrientes; Consejo Federal de Inversiones; Servicio Nacional de Calidad y Sanidad Agroalimentaria; Corporación de Mercado Central de Buenos Aires. Página/s: 94. ISBN 987-987-05-6059-3. Hospedero: Mandarino.
- Christakopoulos P, Nerinck W, Krkos D, MacrisB, Claeysens M. 1996. Purification and characterization of two low molecular mass alkaline xylanases from *Fusarium oxysporum* F3. *J Biotechnol.*; 51: 181–9.
- Colombo, M.H. 2003. Manejo de Enfermedades en Cultivos Protegidos de Tomate. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA); Revista Idia XXI N° 4; Agosto de 2003. Página/s: 142 - 146. URL: <http://www.inta.gov.ar/ediciones/idia/horticola/tomate02.pdf>. Fecha de consulta: 22/10/2010. Hospedero: Tomate.
- Desjardins, A.E.; Hohn, T.M., and McCormick, S. 1993. Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species: chemistry genetics, and significance. *Microbiol. Rev.*, Vol., 57, No.3 p 595-604.
- De La Isla, L. Fitopatología, Mexico D.F. editorial Limusa 1994
- Dickman, MB, Patil, SS, y Kolattukudy, PE 1982. La infección latente de la papaya causada por *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Dis.* 67:748-750.
- E. Alvarez, C. Ospina, J. Mejía y G. Llano. 2002 Caracterización morfológica, patogénica y genética del agente causal de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) en guanábana (*Armona muricata*) en el Valle del Cauca. *Fitopatología colombiana*. Vol. 28 (1). 2002.
- Hunter, J.E., y Buddenhagen, I.W. 1972. Incidencia, epidemiología y control de enfermedades del fruto de la papaya en Hawai. *Trop. Trop. Agric. (Trinidad)* 49:61-71.
- Galleta, G y D. Himelrick, 1990, Small fruit crop management Prentice-Hall, Enlewood Cliffs.
- Grainge, M., and Ahmed, S. 1988. Handbook of Plants with Pest Control Properties. John Wiley and Sons. New York, USA. 470p.
- Laplante K.L., Sarkisian S.A., Woodmansee S., Rowley D.C., Seeram N.P. 2012. *Phytother Research*. Effects of Cranberry Extracts on Growth and Biofilm

Production of *Escherichia coli* and *Staphylococcus* species. 10.1002/ptr.4592. (Electronic Publications).

- Larran, S.; Mónaco, C.; Alippi, H.E. 2001. Endophytic fungi in leaves of *Lycopersicon esculentum* Mill. Universidad Nacional de La Plata; Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales; Departamento de Sanidad Vegetal; Centro de Investigaciones de Fitopatología; World Journal of Microbiology & Biotechnology 17: 181-184, 2001. Página/s: 181-184. URL: <http://www.springerlink.com/content/u2573g776x7vv83u/fulltext.pdf>. Fecha de consulta: 18/10/2010. Hospedero: Tomate.
- Lucia Afanador-Kafuri, DrorMinz, Marcel Maymon, and Stanley Freeman. 2003. Characterization of *Colletotrichum* Isolates from Tamarillo, Passiflora, and Mango in Colombia and Identification of a Unique Species from the Genus. Ecology and population. Vol. 93, No. 5, 2003 579-587.
- Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. Brock., Biología de los microorganismos. Octava edición. Prentice Hall Iberia. Madrid; 2000; 155.
- Mathews, C. K., Van Holde, K. E. & Ahern, K. G. 2003, Bioquímica, 3 edición, pp.204. ISBN 84-7892-053-2.
- Medeiros L. V. , Maciel D.B., Medeiros V.V., Houllou Kido L.M., Oliveira N.T. Geneticals Molecular Research. 2010. *pelB* gene in isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* from several hosts. Apr 13; 9(2):661-73.
- Montes-Belmont, R., 1996. Productos naturales de origen vegetales para el combate de fitopatógenos. Revista Mexicana de Fitopatología. 14:9-14.
- Nita-Lazar M., Chevolut L., Iwahara S., Takegawa K., Furmanek A., Lienart Y. 2002. High performance liquid chromatography and photodiode array detection of ferulic acid in *Rubus* protoplasts elicited by O-glycans from *Fusarium sp.* M7-1. Acta Biochim Pol. 49(4):1019-27.
- Nita-Lazar M., Heyraud A., Gey C., Braccini I., Lienart Y. 2004. Novel oligosaccharides isolated from *Fusarium oxysporum* L. Rapidly induce PAL activity in *Rubus* cells. Acta Biochim Pol. 2004; 51(3):625-47.
- P.D. Roberts, Florida Centro de Investigación y Educación, Immokalee, F.L. K. Pernezny, profesor de Investigación y Educación Everglades, Belle Glade, F.L. T.A. Kucharek, profesor, Departamento de Patología Vegetal, Gainesville, F.L: Departamento de Patología Vegetal, Servicio de Extensión Cooperativa,

Instituto de Alimentos y Ciencias Agrícolas de la Universidad de Florida, Gainesville, 32611.2009

- Sambrook, J. & Russel, D, W. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory manual, 3rd ed. Edición, Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. ISBN 0-87969-576-5.
- Stauffer, B.A., Orrego, F.A. y Aquino, J.A. 2000. Selección de extractos vegetales con efecto fungicida y/o bactericida. Revista de Ciencia y Tecnología (Universidad Nacional de Asunción, Paraguay) 1:29-33.
- Trujillo, E.E., y Obrero, F.P. 1999. La antracnosis de la papaya hojas causada por *Colletotrichum gloeosporioides* Plant Dis. Rep. 53:323-325.
- Watson, J, D., Baker, T. A., Bell, S. P., Gann, A., Levine, M. & Losinck, R. 2004. Molecular Biology of the Gene, Fifth edition, San Francisco: Benjamin Cumming. ISBN 0-321-22368-3.
- Vidales, F. I. 1999. Propagacion in vitro de zarzamora. En: tecnologías llave en mano Tomo 1 Division Agricola. SAGAR-INIFAP.
- Zavaleta-Mejía, E. 1987. Modificadores orgánicos en el manejo de enfermedades de la raíz. Revista Mexicana de Fitopatología 5:159-168.

#### 14.1 SITIOS WEB CONSULTADO

- Instituto de Alimentos y Ciencias Agrícolas de la Universidad de Florida. Original Publication Date: September 2001. Fecha de publicación original septiembre de 2001. Acceso 20/Octubre/2012 <http://edis.ifas.ufl.edu>.
- Muñoz R. M. y Juarez M. R. El mercado mundial de la frambuesa y zarzamora Acceso 09-Sep-2012. <http://www.docstoc.com/docs/44070927/EL-MERCADO-MUNDIAL-DE-LA-FRAMBUESA-Y-ZARZAMORA>

- (Ellis David, *Colletotrichum coccodes*. The University of Adelaide, mycology online. Copyright © 2012 The University of Adelaide, last modified 03/Enero/2012, cricos provider number 00123M. Acceso 30/ Enero/2012. [http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal\\_Descriptions/Coelomycetes/Colletotrichum](http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Coelomycetes/Colletotrichum)).
- Santos, E. PCR y Diagnóstico Molecular. Madrid España. © Lifescienciendceslab enero-febrero 2009. Acceso 12/Diciembre/2011.<http://www.lifesciencienciaslab.com>.
- Departamento de Patología Vegetal, Gainesville, FL: Departamento de Patología Vegetal, Servicio de Extensión Cooperativa, Instituto de Alimentos y Ciencias Agrícolas de la Universidad de Florida, Gainesville, 3261. Acceso 01/Diciembre/2011. <http://edis.ifas.ufl.edu>.
- El sol de Morelia, Silvia Hernández González. © El sol de Morelia 5 de mayo 2010. Se fortalece la producción de zarzamora en Michoacán. Acceso 18/Noviembre/2011 [.http://www.oem.com.mx/elsoldemorelia/notas/n1621436.htm](http://www.oem.com.mx/elsoldemorelia/notas/n1621436.htm).
- Invasive .Org, Center for Invasive Species and Ecosystem Health.© 29 de Abril 2009. *Colletotrichum gloeosporiodes*. Acceso 18/Noviembre/2011. <http://www.invasive.org/browse/detail.cfm?imgnum=2171049>).
- GEFOR, galería de imágenes © GEFOR junio 2011. *Fusarium oxysporum*. Acceso 30/ Enero/2011. <http://www.gefor.4t.com/hongos/fusariumoxysporum.html>.
- Universidad EARTH, 2011 Biología y Control de Enfermedades del Cultivo Reproducción, Infección y ciclo de vida de la enfermedad Acceso 10/ Octubre/2012. [http://www.proyectopromes.org/userfiles/file/Programa%20Accion-Produccion/modulo\\_3.pdf](http://www.proyectopromes.org/userfiles/file/Programa%20Accion-Produccion/modulo_3.pdf)