



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

TESIS

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE
COLLETOTRICHUM SPP. EN *RUBUS FRUCTICOSUS* EN
MICHOACAN.**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO.

PRESENTA:

pQFB. JOSE LUIS REMIGIO ACEVEDO.

ASESOR: DC. RAFAEL ORTIZ ALVARADO

MORELIA, MICH. JUNIO DE 2012.



EL PRESENTE TRABAJO TESIS HA SIDO REALIZADO EN LOS LABORATORIOS DE INVESTIGACIÓN DE LA FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO Y LA CONCURRENCIA DE UNA BECA TIPO TESIS PROPORCIONADA A TRAVES COORDINACIÓN NACIONAL DE BECAS PARA LA EDUCACIÓN SUPERIOR POR EL PROGRAMA BECANET, DENTRO DE LA CONVOCATORIA 2011 Y CON EL NÚMERO DE EXPEDIENTE NO. FOLIO: 20110089544 Y EQUIPAMIENTO A TRAVÉS DE PROMEP EXPEDIENTE EXB-UMICH-139.

Agradecimientos.

A dios:

Por permitirme seguir estando aquí, por darme la dicha de sortear con todo lo q me ha llegado ya sea bueno o malo, por darme salud y lucidez para vivir cada día al máximo y permitirme rodearme de personas que han visto algo bueno en mi.

Al profesor:

MC. Álvaro Rodríguez Barrón por darme ánimos para atreverme a dar pasos de los cuales tenia el temor fracasar, por darme consejos para ver que puedo lograr cosas grandes si me las propongo.

A mi asesor:

DC. Rafael Ortiz Alvarado por haber apostado a mi favor y apoyarme con los medios necesarios para la realización de este trabajo de investigación el cual abrió un nuevo aspecto en mi camino de crecimiento como persona, por depositar su confianza en mi y hacerme ver que no hay imposibles solo procesos largos.

A mis sinodales:

MC. Álvaro Rodríguez Barrón.

DC. Rubén Chávez Rivera.

QFB. María del Rocío Lara Madrigal.

Por tomarse el tiempo para revisar este trabajo, así como de críticas y sugerencias para complementarlo.

A mis compañeros y amigos:

Sergio, José Luis, Elías, Víctor, Guillermo, Salomón, Iván, Pablo los cuales compartieron esta parte de mi camino, fueron cómplices de muchas fiestas así como noches de desvelo realizando trabajos, agradecerles por reír a mi lado y aguantar mi mal humor siempre ,así como mis desplantes, ante todo gracias por estar hay dándome ánimos cuando lo necesite.

A mis amigos:

Omarin, shaggy, Mickey, Jerson, Torres, gordito, Óscar, rigo, el tío, Cirilo, kopetes, el mayo, el negro, Toñito, chicharo, charros, sponchs, julio que han estado gran parte de mi vida respaldándome y cuidándome cuando lo he necesitado, mas importante por decirme en sus palabras que no me rindiera y continuara hasta el final gracias.

Dedicatoria.

A mis padres Ma. Consuelo Acevedo Carrillo y José Remigio Zavala por haberme engendrado, por haberme permitido vivir y darme las armas y recursos necesarios que estuvieron a su alcance para crecer, caer, superarme y llegar a lograr todo aquello que soñé de niño.

En especial a mi madre Ma. Consuelo Acevedo Carrillo por darme todo lo que estuvo a su alcance, por cuidarme, ayudarme a crecer como persona, por ser una madre excepcional, una amiga, una confidente.

A mi tío Héctor Negrete Martínez † el cual confió en mí y me considero como uno de sus hijos, y él para mí como un segundo padre el cual estuvo hay para darme palabras de aliento para seguir y no perder el camino, para no perder mi esencia como ser humano, para llegar a mis metas.

Estoy seguro que aunque él no está aquí ya a mi lado, le dará mucho gusto saber que todo lo que me enseñó a dar frutos y espero que este orgulloso de mí, que permanezca como ese ángel guardián que está conmigo cada vez que estoy titubeante y pienso dejar el buen camino.

A mi pequeña hermana Yajaira Yadira Remigio Acevedo a la cual quiero como si fuese mi hija, ya que al ver una sonrisa en su rostro y el esmero que dedica, me hace imaginar que tengo algo por lo cual continuar por el buen camino para poder ofrecerle algo más en un futuro.

Índice.

| | |
|---|------|
| Índice..... | V |
| Índice de tablas..... | VIII |
| Índice de figuras..... | IX |
| Abreviaturas..... | XI |
| 1.- Resumen..... | 1 |
| 2.- Introducción..... | 2 |
| 2.1.- Variedad de zarzamora..... | 2 |
| 2.2.- Importancia económica..... | 2 |
| 3.- Antecedentes..... | 4 |
| 3.1- Riesgos fitopatológicos..... | 4 |
| 3.1.1.- Organismos causales..... | 4 |
| 3.1.2.- Síntomas..... | 11 |
| 3.1.3.- Ciclo de la enfermedad y epidemiología..... | 11 |
| 3.2.- Técnicas de biología molecular..... | 12 |
| 4.- Planteamiento del problema..... | 14 |
| 5.- Justificación..... | 15 |
| 6.- Hipótesis..... | 16 |
| 7.- Objetivo general..... | 17 |
| 8.- Objetivos específicos..... | 17 |

| | |
|---|-----------|
| 9.- Material y métodos..... | 18 |
| 9.1.- Recolección de muestras para <i>Colletotrichum spp</i> por GPS | 18 |
| 9.2.- Aislamiento, identificación y extracción de especies de los géneros <i>Fusarium sp</i> y <i>Colletotrichum spp</i>..... | 18 |
| 9.2.1.- Medios de cultivo utilizados | 18 |
| 9.2.2.- Reactivos utilizados..... | 22 |
| 9.3.-Elaboracion de MIC's para determinar la resistencia a antifungicos del fitopatogeno del genero <i>Colletotrichum spp</i>..... | 22 |
| 9.3.1.- Elaboración de MIC's..... | 22 |
| 9.3.2.- Método para MIC's..... | 23 |
| 9.3.3.- Elaboración de cálculos para MIC's..... | 23 |
| 9.3.4.- Reactivos utilizados..... | 24 |
| 9.4.- Integridad, extracción y purificación de ácidos nucleicos para la caracterización del genero <i>Colletotrichum spp</i>..... | 25 |
| 9.4.1.- Extracción de ácidos nucleicos..... | 25 |
| 9.4.1.1.- Recuperación de micelio para la prueba..... | 26 |
| 9.4.1.2.- Proceso de extracción de ácidos nucleicos..... | 27 |
| 9.4.2.- Reactivos utilizados..... | 28 |
| 9.4.3.- Método de electroforesis..... | 29 |
| 9.4.4.- Cálculos utilizados para la concentración de ácidos nucleicos..... | 31 |
| 9.5.- Identificación por técnicas de aplicadas a muestras purificadas de ácidos nucleicos pertenecientes a los géneros <i>Fusarium sp</i> y <i>Colletotrichum spp</i>..... | 32 |

| | |
|--|----|
| 9.5.1.- Reacción en cadena de la polimerasa..... | 32 |
| 10.- Resultados..... | 34 |
| 10.1.- Resultado del comparativo en aislado de la muestra de agente fitopatógeno del genero <i>Colletotrichum spp.</i> | 34 |
| 10.2.- Resultados obtenidos de la identificación y caracterización del agente fitopatogeno <i>Colletotrichum spp</i> por medio de la metodología clásica..... | 36 |
| 10.3.- Resultados obtenidos de la identificación y caracterización del agente fitopatogeno <i>Colletotrichum spp</i> por medio de métodos moleculares..... | 38 |
| 10.4 Resultados obtenidos del método medio mínimo inhibitorio (MIC's.) respecto a la resistencia con la que cuentan <i>Colletotrichum spp</i> ante un antifungico..... | 42 |
| 10.4.1.- Resultados obtenidos del método placa MIC's | 42 |
| 10.4.2.- Resultados obtenidos del método líquido/agitación constante para MIC's..... | 49 |
| 11.- Discusión..... | 54 |
| 12.- Conclusiones..... | 56 |
| 13.- Perspectivas..... | 57 |
| 14.- Glosario..... | 58 |
| 15.- Bibliografías..... | 62 |
| 16.- Anexos..... | 66 |
| Anexo No 1. Mapeo GPS puntos clave de recolección..... | 66 |
| Anexo No 2. Extracción de ácidos nucleicos (traducción)..... | 67 |

Índice de tablas.

| | |
|--|----|
| 1. Propiedades físico-químicas del oxiclورو de cobre utilizado como reactivo para elaboración de método MIC's..... | 24 |
| 2. Resultados del muestreo por medio del GPS..... | 34 |
| 3. Resultados de la morfología colonial de <i>Colletotrichum spp</i> obtenida mediante medios APD y YPG..... | 36 |
| 4. Resultados de la morfología microscópica de <i>Colletotrichum spp</i> mediante una tinción simple, observadas a 40x y 100x de muestra obtenida mediante medios APD y YPG..... | 37 |
| 5. Lectura espectrofotométrica de la extracción de ácidos nucleicos..... | 39 |
| 6. Concentraciones de antifungico en la elaboración de MIC's método placa..... | 42 |
| 7. Concentraciones de antifungico en la elaboración de MIC's método liquido/agitación constante..... | 49 |
| 8. Resultados obtenidos (comparativa) sobre la inhibición de los diferentes métodos MIC's..... | 41 |

Índice de figuras.

| | |
|---|----|
| 1. Agrupación de conidióforos respecto a su morfología de los agentes fitopatógeno..... | 6 |
| 2. A. clasificación científica de <i>Colletotrichum gleosporioides</i> ; B. Imagen de las conidias. C. Cultivo de <i>Colletotrichum gleosporioides</i> (medio utilizado Agar Papa Dextrosa)..... | 7 |
| 3. A. clasificación científica de <i>Colletotrichum coccodes</i> ; B. Imagen de las conidias; C. Cultivo de <i>Colletotrichum coccodes</i> (medio utilizado Agar Papa Dextrosa)..... | 8 |
| 4. 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> (medio utilizado YPG). | 10 |
| 5. ejemplificación de calculos para elaboracion de MIC's referentes a el apartado 9.3.3..... | 23 |
| 6. Equipo utilizado para extracción de ácidos nucleicos de nueva generación ZYMO RESEACH, ZRfungal/Bacterial, DNA Mini Prep..... | 26 |
| 7. Proceso de electroforesis..... | 30 |
| 8. Proceso de electroforesis..... | 30 |
| 9. Ejemplificación de cálculos para concentración obtenida en la Tabla No 5 del apartado correspondiente a resultados | 31 |
| 10. (A) <i>Colletotrichum gleosporioides</i> . Secuencia de ARN de 18S Ribosomal perteneciente a <i>Colletotrichum gleosporioides</i> . ACCESSION JQ366003..... | 33 |
| 10. (B) <i>Fusarium oxysporum</i> . Secuencia de ARN de 18S Ribosomal perteneciente <i>Fusarium oxysporum</i> . ACCESSION JQ946644..... | 33 |
| 11. comparativo para aislamiento del organismo fitopatogeno | 35 |

| | |
|--|-----------|
| 12. Gel de Integridad del material genético (ADN) proveniente de las muestras aisladas de los fitopatógenos fúngicos..... | 40 |
| 13. Correspondiente a la PCR de los agentes fitopatógenos..... | 41 |
| 14. MIC's referente al 1% método placa..... | 43 |
| 15. MIC's referente al 0.5% método placa..... | 44 |
| 15. Continuación MIC's referente al 0.5%..... | 45 |
| 16. MIC's referente al 0.1% método placa..... | 46 |
| 16. Continuación MIC's referente al 0.1%..... | 47 |
| 17. MIC's referente al 0.05% método placa..... | 48 |
| 18. MIC's referente al 1% método liquido con agitación constante..... | 50 |
| 19. MIC's referente al 0.5% método liquido con agitación constante..... | 51 |
| 20. MIC's referente al 0.1% método liquido con agitación constante..... | 52 |
| 21. MIC's referente al 0.05% método liquido con agitación constante..... | 53 |

Abreviaturas.

| | | | |
|--------------|----------------------------------|-----------------|--------------------------------------|
| °C | Grados Celsius. | Hrs | Horas. |
| µg | Microgramos. | mAmp | Miliamperes. |
| µl | Microlitros. | mg | Miligramos. |
| µm | Micrómetros. | MICS | Medio Mínimo Inhibitorio. |
| Abs | Absorbancia. | Min | Minutos. |
| Ac | Acido. | mL | Mililitros. |
| ADN | Acido Desoxirribonucleico. | mm | Milímetros. |
| APD | Agar Papa Dextrosa. | NC | No clasificado. |
| aprox | Aproximado. | NP | No procede. |
| ARN | Acido Ribonucleico. | Ox. Cu | Oxicloruro de cobre. |
| CAS | Chemical Abstract Servic. | pb | Pares de bases. |
| cbp | Cuanto baste para. | PCR | Reacción en cadena de la polimerasa. |
| cDNA | DNA complementario. | rpm | Revoluciones por minuto. |
| CL50 | Concentración letal media. | Seg | Segundos. |
| DL50 | Concentración letal media. | Sp | sin especie. |
| dNTP | Desoxinucleotidos triptófano. | STD | Medio estándar. |
| DQD | Demanda Química de oxígeno. | volt | voltios. |
| EDTA | Acido etilendiaminotetraacetico. | YPG | Yeast, peptone, glucose |
| % | porcentaje/por ciento | M molar. | |

1. Resumen.

La región de los Reyes de Salgado es un valle con un vocación agrícola, las 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 la cual es una 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, Periban y Tocuambo, y permitiendo la ocupación de hasta 60 mil puestos laborales.

La problemática en este tipo de cultivos *Rubus fruticosus* se ven afectados por agentes fitopatógenos los cuales tienden a desencadenar una enfermedad conocida como *antracnosis* esta causada por un hongo del género *Colletotrichum*, que es un tipo muy común fitopatógenos , y que son responsables de enfermedades en las especies vegetales en todo el mundo. Generalmente la identificación del género *Colletotrichum spp.* se basa en más de una característica, como la apariencia física y la patogenicidad en el huésped. Muchas especies de *Colletotrichum spp.* infectar a más de un hospedero, y puede dificultar a la identificación diferencial de más de un fitopatógeno, como por ejemplo *Fusarium sp.* el presente trabajo se presenta una metodología molecular, que permite la identificación del genero *Colletotrichum spp.*, en el género comercial *Rubus*, adicionalmente el microorganismo aislado se caracterizo en base a su resistencia al antifungico comercial oxiclورو de cobre, obteniendo datos que permiten verificar la eficacia de esta substancia en campo, y 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.

2. Introducción.

2.1 Variedad de Zarzamora:

Zarzamora Tupi es una variedad híbrida, que es fruto de las variedades de Comanche y Uruguay. Esta variedad es la variedad principal en México. La variedad Tupi produce frutos grandes, con una coloración negro, uniforme y un sabor perfectamente equilibrado que se cierne entre la acidez y el azúcar. 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.

2.2 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, 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 es el lugar que 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 100 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.

Los cambios climatológicos severos en los cuales existe un aumento en la precipitación pluvial, esto 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, microorganismos fúngicos identificados en especies del género *Rubus*, al cual pertenecen las especies comerciales explotadas en la región de los Reyes como los arandanos, 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 fitopágenos, los hongos fitopágeno causan desordenes y 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, glucanasas, xilanasas (Benhamou *et al.*, 1990; Alconada & Martinez, 1995; Christakopoulos *et al.*, 1996) 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*, la identificación para especies de fitopatógenos fúngicos como *F. oxysporum* y del *Colletotrichum spp* (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 *Fusarium oxysporum* y del Genero *Colletotrichum spp* 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 competitividad de los cultivos.

3. Antecedentes.

3.1 Riesgos fitopatológicos:

Los hongos fitopatógenos entre ellos las especies del género *Colletotrichum spp*, representan un problema en la producción de diversos cultivos en donde destacan a nivel local la producción de *Persea americana variedad Hass* (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 spp* (arandanos) que son también cultivados en la región de Los Reyes, Tocumbo y Periban.

3.1.1 Organismos causales:

La antracnosis es causada por un hongo del género *Colletotrichum spp*, 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 *coccodes*. (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. <http://edis.ifas.ufl.edu>).

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

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. La Información sobre la gama de huéspedes de este hongo se puede encontrar en otros textos científicos los cuales abordan las características de este agente fitopatógeno, respecto a los diversos huéspedes donde se logran encontrar al agente en cuestión.

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 μm de ancho, destacar que el agente fitopageno cuenta también con masas de conidias de color rosado o de color salmón. La cera de los acérvulos, que se producen en los tejidos infectados, son sub-epidérmicas, por lo general con setas, y simple, conidióforos cortos, erectos (Burger, et al 1921).

Colletotrichum coccodes. Es un fitopatógeno de la planta, siendo *C. 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 esta conformado por numerosos esclerocios de un color negro y masas conidias de color marrón claro, las cuales se observan por su lado inverso con una coloración marrón oscuro (Larran, S, et al 2001).

Los esclerocios son generalmente abundante, cubierto de múltiples cerdas, esférico y a menudo confluentes. El agente fitopatógeno cuenta con conidioforos rectos, fusiforme, atenuado en los extremos, con un tamaño de 16-22 X 3-4 μm . 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 16,5-9.5µm, así como de una forma variable (Brandán de Antoni, et al 2009).

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) (The University of Adelaide, mycology online. Copyright © 2012 The University of Adelaide, last modified 03/Enero/2012, David Ellis, cricos provider number 00123M. *Colletotrichum coccodes*. Acceso 30/ Enero/2012. http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Coelomycetes/Colletotrichum).

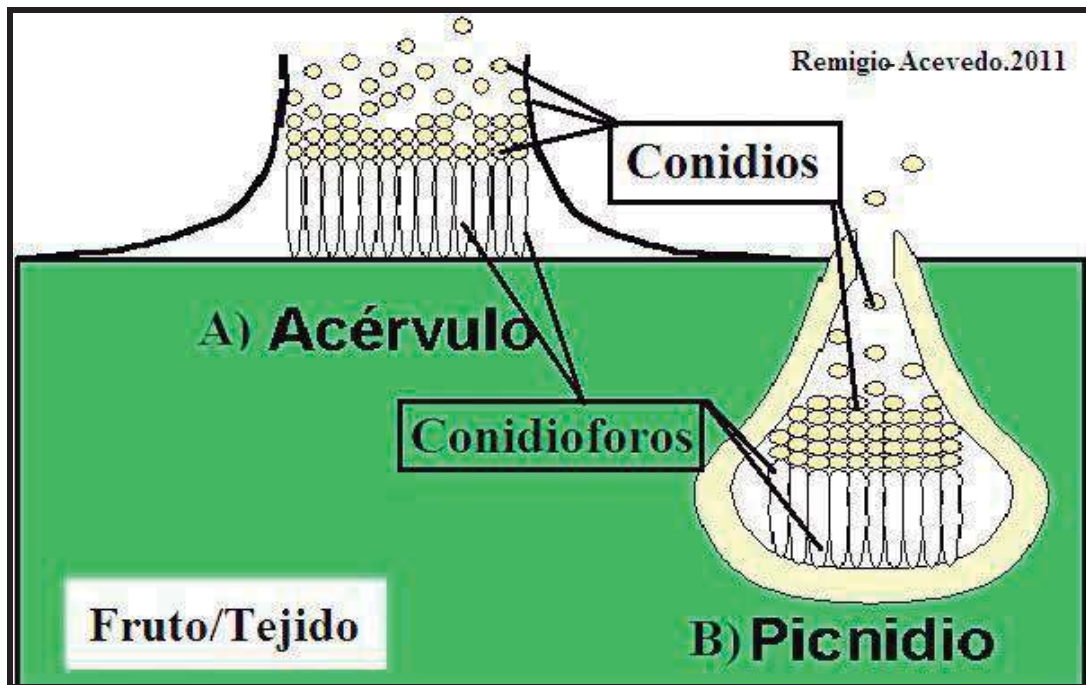


Figura No 1. Agrupación de conidióforos respecto a su morfología de los agentes fitopatógenos (Remigio-Acevedo.2011)

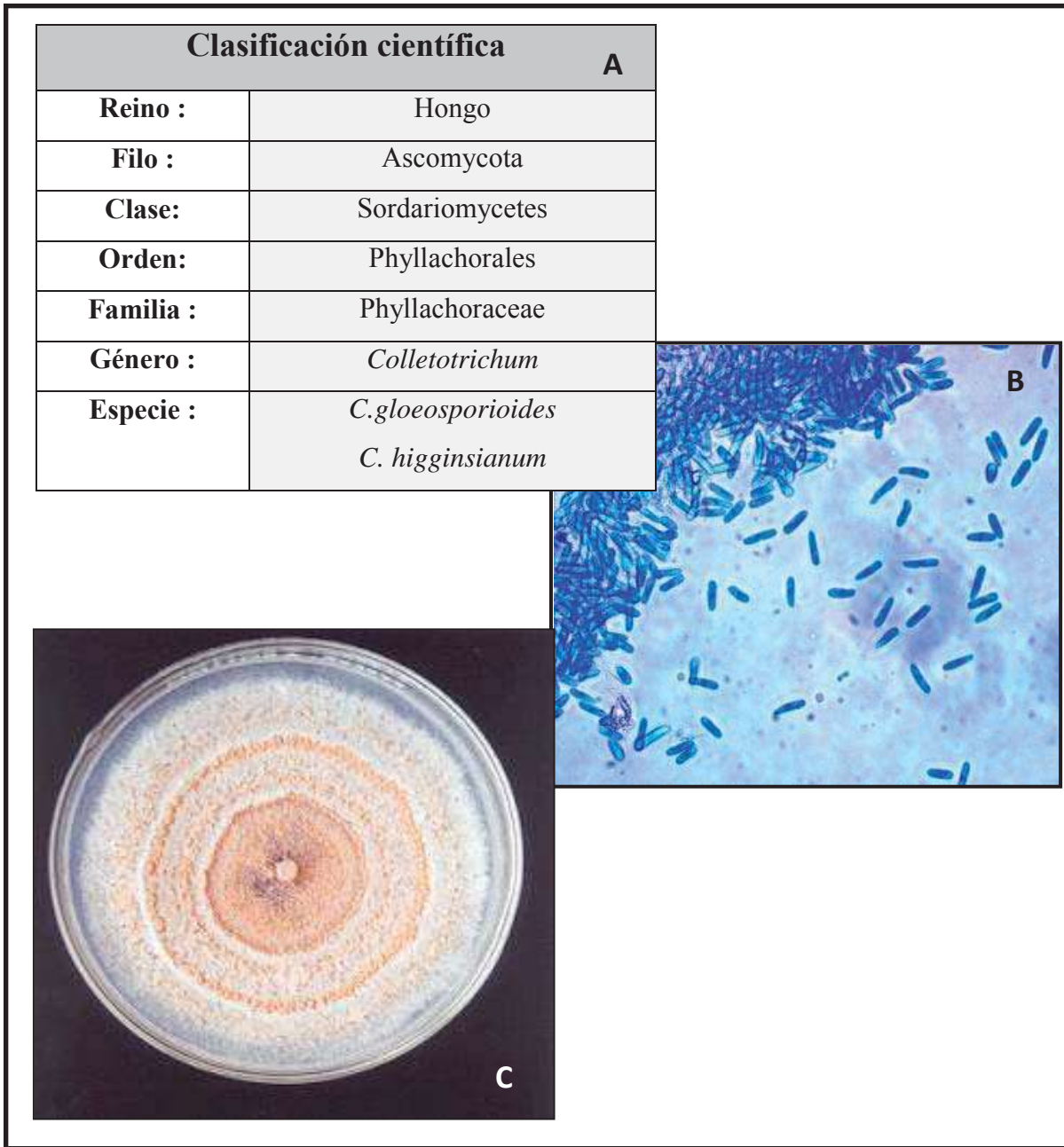


Figura No 2. A. clasificación científica de *Colletotrichum gloeosporioides*; B. Imagen de las conidias. C. Cultivo de *Colletotrichum gloeosporioides* (medio utilizado Agar Papa Dextrosa) (Cesar Calderón. USDA APHIS PPQ. USA. 2009).

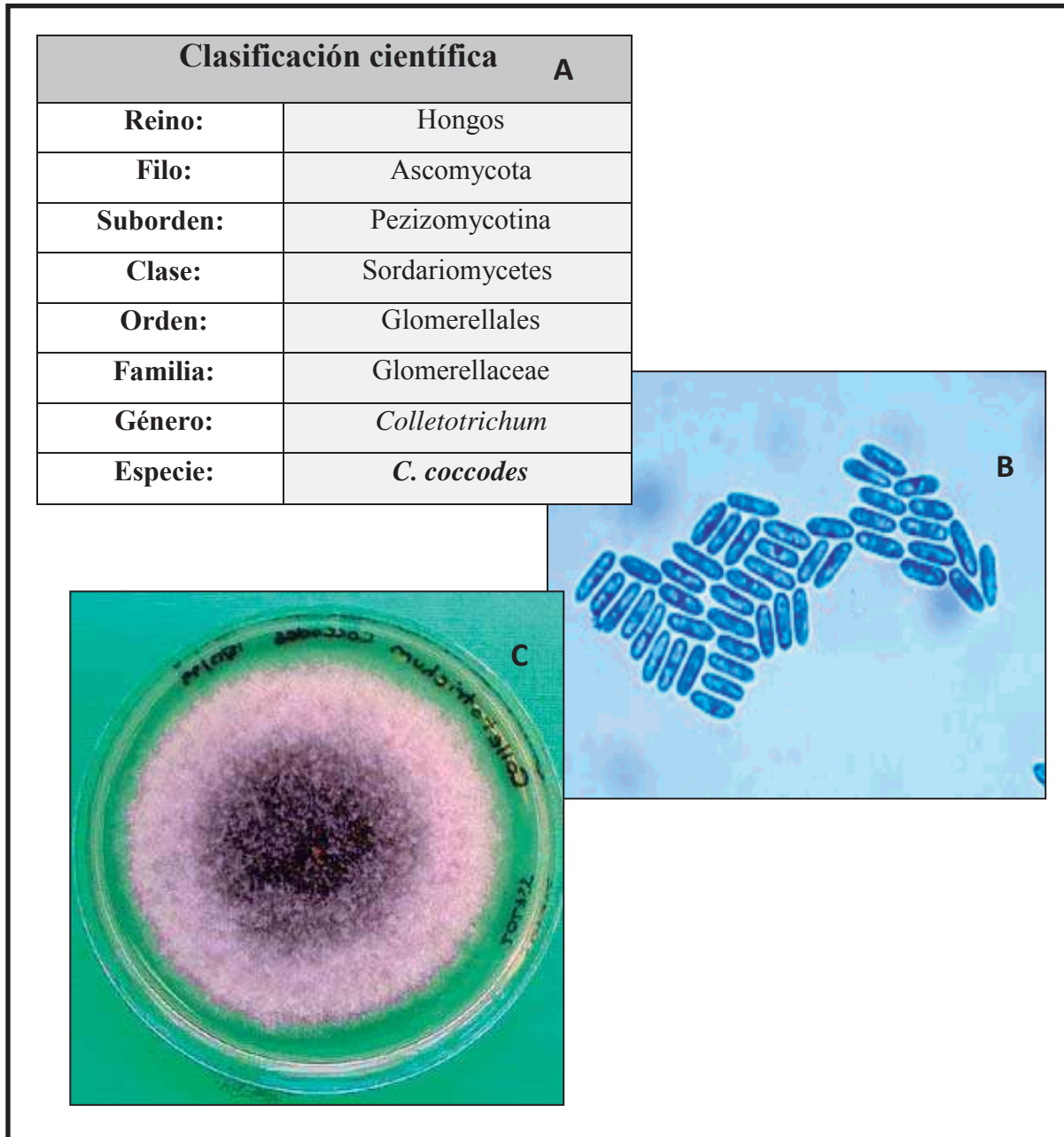


Figura N° 3. A. clasificación científica de *Colletotrichum coccodes*; B. Imagen de las conidias; C. Cultivo de *Colletotrichum coccodes* (medio utilizado Agar Papa Dextrosa). (The University of Adelaide, mycology online. © 2012 The University of Adelaide, last modified 03/Enero/2012, David Ellis, cricos provider number 00123M. *Colletotrichum coccodes*. Acceso 30/ Enero/2012. http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Coelomycetes/Colletotrichum).

Fusarium oxysporum.

Aspecto de la colonia (En agar YPG)

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.

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 1 a 5 tabiques 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.

Información de interés clínico:

Es un patógeno de plantas común. Puede causar infección corneal y onicomicosis 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 cornea 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 onicomicosis es muy difícil de tratar requiriendo extirpación quirúrgica de la uña (GEFOR, galería de imágenes © GEFOR junio 2011. *Fusarium oxysporum*. Acceso 30/ Enero/2011. <http://www.gefor.4t.com/hongos/fusariumoxysporum.html>).

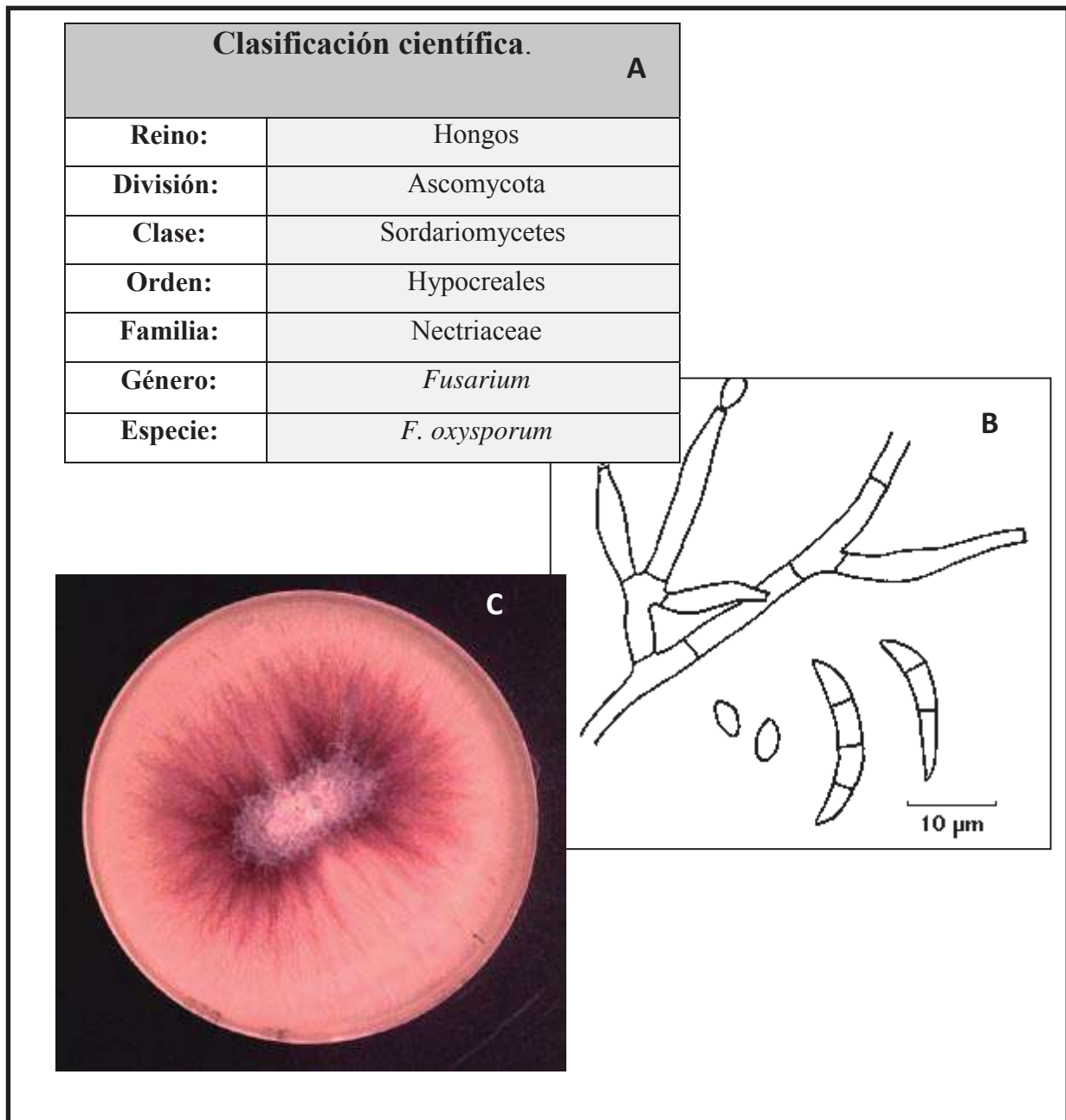


Figura No 4. A. clasificación científica de *Fusarium oxysporum*; B. Imagen de los conidióforos y macroconidias en forma de media luna; C. Cultivo de *Fusarium oxysporum* (medio utilizado YPG). (GEFOR, galería de imágenes © GEFOR junio 2011. *Fusarium oxysporum*. Primera fecha de acceso 30/ Enero/2011. <http://www.gefor.4t.com/hongos/fusariumoxysporum.html>).

3.1.2 Los síntomas:

Colletotrichum spp así como *Fusarium sp* son capaces de causar enfermedad 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, E.E., 1969).

Los síntomas comienzan en un principio como lesiones acuosas que se vuelven suaves, ligeramente hundidas, y se convierten en fuego. 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 la acérvulos son comunes dentro de las manchas de la fruta.
- En algunos casos, las lesiones son de color marrón, no de color naranja, negro y luego de la formación de setas y esclerocios (una estructura oscura, la supervivencia de hongos).

3.1.3 Ciclo de la enfermedad y epidemiología:

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. La infección de las frutas se da cuando las esporas del hongo o residuos infestados están en la lluvia y estas salpican a las plantas. Nuevas esporas se producen en el tejido infectado y luego se dispersan a otras frutas.

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 mas relevancia en cuanto a la dispersión de un cultivo a otro, hablemos de una especie a otra (Instituto de Alimentos y Ciencias Agrícolas de la Universidad de Florida. Fecha de publicación original septiembre de 2001. <http://edis.ifas.ufl.edu>.)

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 porque las esporas se lavan o salpicado a otras frutas provocando más infecciones. La enfermedad es más probable que se desarrollan en la fruta madura que está presente durante un largo período en la planta, aunque puede ocurrir en frutos tanto inmaduros y maduros.

3.2 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 mas profundo de diversas especies patógenas facilitando en gran medida su identificación.

Una de las técnicas mas 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 ingles, cuyo objetivo es obtener un gran numero 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 utilizo un tipo llamado RT-PCR (PCR en transcriptasa reversa), 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).

4. Planteamiento del problema.

Hasta la fecha en el estado de Michoacán no existen reportes científicos que aborden la caracterización biológica, de resistencia a antifúngicos comerciales y molecular de fitopatógenos fúngicos como son los géneros *Colletotrichum sp* y *Fusarium sp*, aislados a partir de lesiones de antracnosis producidas en el cultivo extensivo zarzamora variedad tupi (*Rubus fruticosus variedad tupi*, explotada comercialmente en la agroindustria de Michoacán.

5. 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 y el Instituto Tecnológico Superior de Los Reyes a través del departamento de Innovación Agrícola se han avocado al estudio de microorganismos fúngicos, a través de herramientas moleculares, generando un mapa local de la prevalencia de estos fitopatógenos en esta importante zona agrícola de México.

6. Hipótesis.

Se identificara y caracterizara a través de biología molecular al hongo fitopatógeno *Colletotrichum spp.* en las especies de *Rubus fruticosus*.

7. Objetivo general.

Mediante técnicas de aislamiento y herramientas moleculares se realizó una identificación y caracterización de *Colletotrichum spp* en *Rubus fruticosus* variedad tupi cultivada en la región de Valle de los Reyes Michoacán.

8. Objetivos específicos:

Aislar e identificar morfológicamente agentes fitopatógenos del género *Colletotrichum spp* a partir de muestras biológicas de los cultivos.

Determinar las Concentraciones Mínimas Inhibitorias para agentes antifúngicos en los aislados del género *Colletotrichum spp*.

Identificar molecularmente a especies de los microorganismos *Colletotrichum spp*, a partir de muestras biológicas de los cultivos del género *Rubus fruticosus*.

9. Material y métodos.

A continuación se citan la metodología seguida para lograr los objetivos planteados anteriormente.

9.1 Recolección de muestras para *Colletotrichum spp* por GPS.

Se utilizó un sistema portátil de geoposicionamiento global (GPS) marca GARMIN modelo GPSmap 60X, que permite la obtención de la georeferencia de Longitud, Latitud y Altitud sobre el nivel del mar con un margen de error de ± 3 mts del sitio del cual se tomo la muestra biológica para su posterior análisis microbiológico.

9.2 Aislar, identificar y extracción a especies de los géneros *Fusarium sp* y *Colletotrichum spp*, a partir de muestras biológicas de los cultivos del genero *Rubus*.

9.2.1 Medios de cultivo utilizados

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 ± 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.

Formulación:

| | | | |
|------------------|---------|---------------------|------------|
| Infusión de Papa | 200.0g. | Agar Bacteriológico | 15.0g. |
| Dextrosa | 20.0g. | pH | 5.6 ± 0.2. |

Preparación:

Método: Suspender 39 g del medio en un litro de agua purificada. 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 Petril estériles.

Almacenamiento: 2-30° C.

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.

Formulación:

| | | | |
|---------------------|-------|-------------------|----------|
| Peptona de Gelatina | 5.0 | Extracto de Carne | 3.0g |
| Agar Bacteriológico | 15.0g | pH | 6.8 ± 0. |

Preparación:

Método: Suspender 23 g del medio en un litro de agua purificada. 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 Petril 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.

Agar (solido/liquido) YPG Sigma- Aldrich.

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

Fundamento: (Bartnicki-Garcia y Nickerson, 1962). 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

Formulación.

| | |
|---------------------------|---------------------------------|
| Extracto de levadura 0.3% | Peptona 1% |
| Glucosa 2% | Agar Bacteriológico 1.5% |
| H ₂ O cbp 1 lt | pH 4.5± 0.2 |

Preparación:

Método: Suspender el medio un litro de agua purificada. 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.

Nota: este medio puede utilizarse como medio de almacenamiento al agregar 1.5% de agar bacteriológico durante el proceso de preparación para obtener medio sólido.

Almacenamiento: 2-30° C.

Medio nutritivo para evitar crecimiento radial del agente fitopatógenos.

Este tipo de medio es modificado con adición de Tritón X-100 lo cual nos ayudara a evitar un crecimiento del fitopatógeno de un modo extensivo en el medio, en otras palabras arrojará resultados que se traducen en colonias del agente fitopatógeno más definidas y aisladas para su posterior manipulación y procesamiento.

Procedimiento:

1. Una vez recolectadas las muestras procedemos a marcarlas para identificar el sitio de donde fueron tomadas.
2. Proceder a inocular con las muestras en diferentes tipos de medio de cultivo en este caso especializados para hongos (medios STD, medio APD y/o medio YPG) esto con el fin de recuperar el organismo, en otras palabras lograr que haya crecimiento para posteriormente aislar el agente (incubar 24 – 72hr/ 27° C).
3. Una vez finalizado el tiempo de incubación revisar e identificar por morfología colonial a nuestro agente fitopatógeno, proceder a sembrar nuestro agente en un medio adecuado para su crecimiento, este paso se realiza con el fin de aislar nuestro agente de interés, de probables hongos ambientales que puedan interferir con su desarrollo (incubar 24 – 72hr/ 27°C).
4. Repetir el paso anterior con el fin de obtener un cultivo axénico del agente Fitopatógeno (incubar 24 – 72hr/ 27°C).
5. En este paso realizaremos resiembra con un medio modificado para evitar el crecimiento radial del agente y obtener colonias aisladas (en este caso APD + tritón x-100 al 0.1%).

9.2.2 Reactivos utilizados.

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%.

9.3 Elaboración de MIC's para determinar la resistencia a antifungicos del fitopatógeno del genero *Colletotrichum spp.*

A continuación se describe tanto en proceso como el material utilizado para la obtención de resultados referentes a este punto:

9.3.1 Elaboración de MIC's.

Este tipo de pruebas constan de dos parte para su elaboración, este tipo de prueba es una comparación con pruebas para determinar la sensibilidad de microorganismos háblese de un antibiograma, los MIC's. (Medios para concentración mínima inhibitoria) no es otra cosa que una técnica igual, aplicada en este caso a los organismos fúngicos, la cual busca la concentración adecuada para la inhibición del fitopatógeno, en este caso modificando un medio de cultivo con la incorporación de diversos antifungicos, tener muy en cuenta que para la elaboración de nuestros MIC_s. Hay diversas técnicas para ello es conveniente valorar que tan efectivas pueden ser para arrojar resultados adecuados, los métodos son el método de placa y el método medio liquido con agitación continua.

9.3.2 Método para MIC's.

1. Elaboración de medio de cultivo adecuado en este caso APD y YPG.
2. Incorporación de antifungico a placas para aislamiento de agente Fitopatógico:

Pesar lo necesario de nuestro fungicida en este caso para alcanzar concentraciones de 1%, 0.5%, 0.1%, 0.05% (p/v).

9.3.3 Elaboración de cálculos para MIC's:

Partiendo prepararemos en primer lugar nuestras placas a una concentración de 1% tendríamos que decir que habrá 1gr de antifungicos /100ml. Ejemplo prepararemos 30ml de nuestro MIC's. Entonces realizaríamos la siguiente operación para saber cuanto agregaríamos de nuestro antifungico:

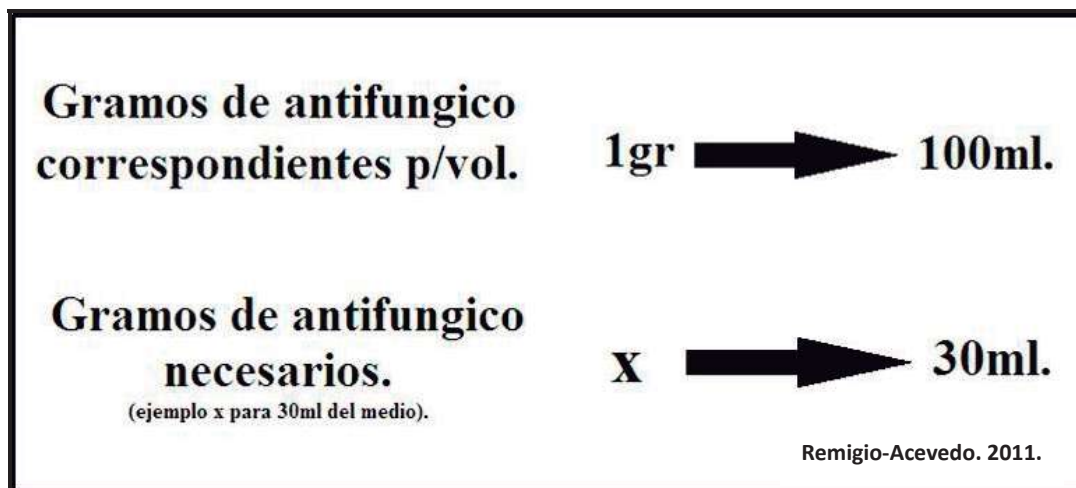


Figura No 5. ejemplificación de calculos para elaboracion de MIC's referentes a el apartado 9.3.3 (Remigio-Acevedo. 2011).

Una vez pesado el antifungico aparece una nueva incógnita cuales el momento adecuado para la incorporación de el antifungico, previamente se debe haber investigado las propiedades físico- químicas de nuestro antifungico como sabemos que la mayoría de

nuestros antifungicos utilizados para fitopatógeno son inestables a altas temperatura, por ello incorporaremos el antifungico después de transcurrido el tiempo de esterilización de nuestro medio de cultivo.

Una vez que el medio haya llegado a una temperatura de 30°C agregar el antifungico, es recomendable utilizar un agitador magnético por 2 minutos para una disolución total.

Verter en cajas petril y esperar solidificación.

9.3.4 Reactivos utilizados.

Oxicloruro de cobre.

Nombre Químico: Oxicloruro de cobre

Sinónimos: Trihidróxido cloruro de dicobre / Cloruro cúprico básico / Cobox

Formula: $\text{Cl Cu}_2 \text{H}_3 \text{O}_3$ / $\text{Cl}_2 \text{Cu}_4 \text{H}_2 \text{O}_2$.

Aplicación: Fungicida.

Tabla No 1. Propiedades fisico-químicas del oxicloruro de cobre utilizado como reactivo para elaboración de método MIC's (Remigio-Acevedo. 2011).

| | | | |
|---|---|-------------------------------------|-----------------|
| Aspecto | Polvo impalpable de color azul. | Propiedades comburentes. | No comburente |
| Punto/intervalo de fusión. | Descompone a 200°C. | Inflamabilidad (sólido gas). | No inflamable |
| Presión de vapor. | Negligible, inferior a 10-7 mbar (pH7, 20°C). | Autoinflamabilidad. | No inflamable |
| Densidad aparente. | 300 g/L. | Olor. | Insignificante. |
| Hidrosolubilidad. | Dispersable en agua. | Peligro de explosión. | No explosivo |
| Liposolubilidad disolvente-aceite. | Insoluble en disolventes orgánicos. | Remigio-Acevedo. 2011. | |

Propiedades de interés del oxiclорuro de cobre.

Fitotoxicidad: Un 0,4% de cobre carece de efecto fitotóxico sobre la mayoría de las bajas temperaturas (< 5°C) y elevada humedad.

Persistencia y degradabilidad: El oxiclорuro de cobre persiste en la planta durante varios meses. Los hongos segregan ácido málico y aminoácidos que solubilizan al cobre facilitando así, su penetración.

Movilidad / bioacumulación: En animales se producen pequeños acúmulos por incorporación en proteínas naturales. Es fuertemente absorbido por el suelo. En ciertos tipos de suelo, un exceso de producto puede provocar una contaminación pasajera, ya que el Cobre se disipa en forma de complejos solubles o precipita como sal insoluble (Sulfuro de cobre).

Solubilidad: Soluble en ácidos diluidos, formando sales de Cu (II) y soluble en hidróxido de amonio formándose complejos iónico.

9.4 Integridad, extracción y purificación de ácidos nucleicos para la caracterización del genero *Colletotrichum spp.*

A través de medios de cultivo líquido se inducirá la formación de micelio total (vegetativo/aéreo) proveniente de los microorganismos aislados de los géneros *Fusarium sp* y *Colletotrichum spp*, para posteriormente proceder al aislamiento, purificación y cuantificación de ácidos nucleicos para su conservación a temperaturas de -80°C. a continuación se citan los métodos y técnicas utilizadas.

9.4.1 Extracción de ácidos nucleicos.

Esta se llevo a cabo mediante dos pasos como son:

- A. Recuperación de micelio para la prueba.
- B. Proceso de extracción de ácidos nucleicos.

9. 4.1.1 Recuperación de micelio para la prueba.

Obtener de un cultivo líquido previo donde se tenga el microorganismo a utilizar por lo menos de 100 a 50 miligramos (peso seco) de micelio total (vegetativo como aéreo). Para la obtención de este es necesario extraer el micelio del medio y depositar en un tubo para proceder a lavar en repetidas ocasiones con solución salina hasta verificar que la muestra esta libre de todo agente para su procesamiento hállese en este caso del medio de crecimiento, para este proceso también es necesario la utilización de centrifuga para que nuestra muestra este lo mayormente libre de cualquier agente que pueda intervenir en el proceso de extracción de ácidos nucleicos.

Para el proceso de extracción como se cita a continuación es conveniente decir que para tal se utilizo un equipo de nueva generación (ZYMO RESEACH, ZRfungal/Bacterial, DNA Mini Prep).



Figura No 6 Equipo utilizado para extracción de ácidos nucleicos de nueva generación ZYMO RESEACH, ZRfungal/Bacterial, DNA Mini Prep (Remigio-Acevedo. 2011).

9.4.1.2 Proceso de extracción de ácidos nucleicos.

1. Colocar en un tubo eppendorf 200 μ l de solución de PBS y agregar de 50 a 100 mg de micelio para suspensión de la muestra.

NOTA: de ser necesario utilizar vortex por un lapso de 2 minutos para la resuspension.

2. Una vez resuspendido el micelio transferirlo a un primer tubo el cual contiene pequeñas perlas de porcelana las cuales ayudaran a la lisis para extracción de nuestro ácidos nucleicos (Bashing Bead Lysis tube), agregar 750 μ l de sol. Para lisis (Lysis Solution), llevar a vortex (vel. Máxima lapsos de 1min a 40seg hasta sumatoria de 5 min).
3. Llevar a microcentrifuga a 10,000 rpm por un lapso de 1 min.
4. Colocar en un tubo de tapa naranja (Zymo - Spin IV Spin Filter) 400 μ l del sobrenadante obtenido de nuestro anterior tubo, llevar a microcentrifuga a 7,000 rpm por un lapso de 1min.

NOTA: recordar quebrar la punta de la parte del filtro antes de realizar el proceso de transferencia.

5. Una vez terminado en tiempo de centrifugado retirar la parte superior de tubo (tapa naranja solo el filtro) y a la parte inferior donde tenemos el fluido agregamos 1,200 μ l de buffer para precipitación (Basal Fungal/Bacterial Binding Buffer) y mezclamos cuidadosamente.
 - A. En un tubo nuevo con filtro (Zymo - Spin IIC colum) procedemos a transferir 800 μ l de nuestra mezcla previa, llevar a microcentrifuga a 10,000 rpm por un lapso de 1 min., procedemos a desechar el liquido de la parte inferior.
 - B. Repetir el paso A.
6. En un nuevo tubo colector procedemos a colocar solo la parte superior (columna) de nuestro tubo utilizado en el apartado A del paso 5, procedemos a agregar 200 μ l

buffer de pre lavado (DNA Pre - Wash Buffer), llevar a microcentrifuga a 10,000 rpm por un lapso de 1 min.

7. Agregar 500 µl buffer de lavado (Fungal/Bacterial DNA Wash Buffer), llevar a microcentrifuga a 10,000 rpm por lapso de 1 min.
8. Transferir solo la columna de paso 7 a un tubo eppendorf y agregar 63 µl el buffer de elución el cual nos servirá para recuperar nuestros ácidos nucleicos (DNA Elution Buffer).

9.4.2 Reactivos utilizados.

Buffer TAE 50X (para 500mL)

Formulación:

| | |
|---------------------------------|---------|
| Trizma – Base (Sigma- Aldrich). | 121g |
| Acido acético (J.T. Baker). | 28.6 mL |
| EDTA Concentración 0.5M/pH 8.0. | 50 mL |
| Agua bidestilada cbp. | 500 mL |

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 Acido 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.

Gel de agarosa (1.5 %).

Formulación:

| | |
|---|----------|
| Agarosa para electroforesis (Sigma - Aldrich) | 0.75 g |
| Buffer TAE 1x | 50 mL |
| Bromuro de etidio (Sigma - Aldrich) | 10 mg/mL |

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.

9.4.3 Método de electroforesis.

1. Elaboración de gel de agarosa, una vez hecho este paso procedemos a agregar buffer TAE 1x hasta que cubra por completo nuestro gel.
2. Colocamos en los canales correspondientes las muestras de nuestros microorganismos previamente preparadas (aprox. 2 μ l de buffer de carga + 8 μ l de muestra de ADN) así como un marcador de peso molecular para la identificación de bases.

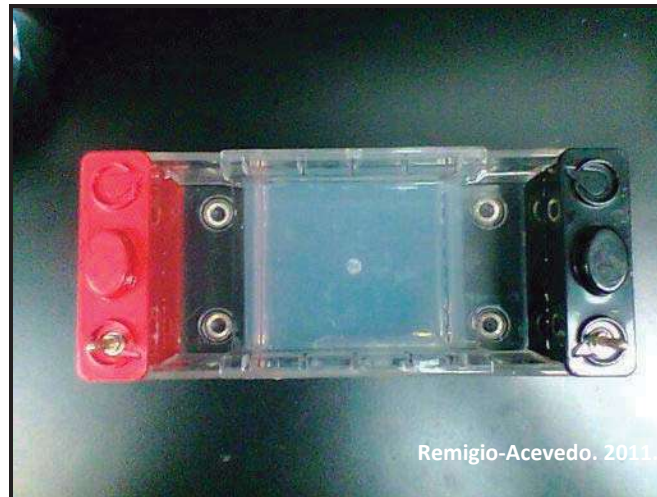


Figura No 7. Proceso de electroforesis (Remigio-Acevedo. 2011).

1. Tapar perfectamente la cámara teniendo cuidado que los electrodos queden perfectamente ensamblados.
2. Proceder a correr el proceso de electroforesis tomando en cuenta las especificaciones para el generador de corriente (90volt's : 80 miliamperes : ± 110 min.).



Figura No 8. Proceso de electroforesis (Remigio-Acevedo. 2011).

3. Observar resultados a luz ultravioleta.
4. Obtener fotografía para corroborar resultados.

9.4.4. Cálculos utilizados para la concentración de ácidos nucleicos.

Para realizar los cálculos necesarios se utilizarán datos que fueron recolectados del previo proceso de espectrofotometría, al cual fueron expuestas nuestras muestras purificadas de sus correspondientes ácidos nucleicos, de aquí se procederá con una metodología muy sencilla como se menciona a continuación:

A). Plantear la constante a utilizar sabemos que:

Acido ribonucleico ARN (1 \rightarrow 40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

Acido desoxirribonucleico ADN (1 \rightarrow 37 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

B). Realizamos una regla de tres utilizando el valor de Absorbancia (Abs) 260nm ya que este es el referente a la concentración de cadenas de ADN gracias a que a esta Abs se cuantifica los dobles enlaces del mismo Observes el ejemplo.

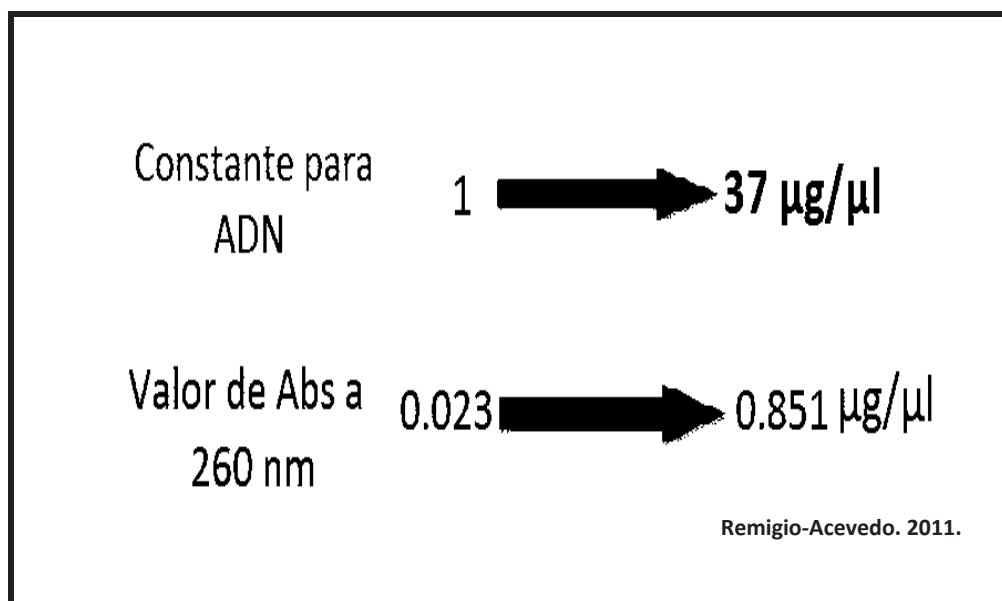


Figura No. 10. Ejemplificación de cálculos para concentración obtenida en la Tabla No 6 del apartado correspondiente a resultados (Remigio-Acevedo. 2011).

9.5 Identificación por técnicas de aplicadas a muestras purificadas de ácidos nucleicos pertenecientes a los géneros *Fusarium sp* y *Colletotrichum spp*.

Los ácidos nucleicos provenientes de cada muestra biológica de los organismos fúngicos por medio de amplificación mediada por la Taq polimerasa (PCR), para corroborar la cepa fúngica aislada y caracterizada, para este apartado se describe a continuación los métodos y técnicas utilizadas para su elaboración.

9.5.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Se utilizaron los siguientes primers:

Colletotrichum gleosporioides.

5'- 3': TTTTgAAAATTgTTgCCT.

3'- 5': TCgAACAggCATgCCCgC.

Fusarium oxysporum.

5'- 3': CCTggAAgACTCATTTTg.

3'- 5': gACgTgACCGCCAATCgA.

El programa de amplificación en el Termociclador Eppendorf 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.

A continuación se muestran las secuencias nucleotídicas para la RT-PCR correspondientes para la caracterización de los agentes fitopatógenos como son *colletotrichum spp* (figura No10-A) y *Fusarium spp* (figura No10-B).

```
1 accctgcgga gggatcatta ctgagtttac gctctataac cttttgtgaa catacctata
61 actgttgctt cggcgggtag ggtctccgag accctcccgg cctcccgcct ccgggcccgg
121 cggcgcgccg cggaggataa ccaaactctg atttaacgac gtttcttctg agtgggtacaa
181 gcaaataatc aaaactttta acaacgggac tcttggttct ggcatcgcag aagaacgcag
241 cgaaatgcga taagtaatgt gaattgcaga attcagtgaa tcatcgaatc tttgaacgca
301 cattgcgcc gccagcattc ggcgggcat gcctgttcga gcgtcatttc aaccctcaag
361 ctctgcttgg tgttggggcc ctacagctga ttagggccct caaaggtagt ggcggaccct
421 cccggagcct ctttgcgta gtaactttac gtctcgcact gggatccgga gggactcttg
481 ccgtaaaacc cccaatttt ccaaagggtg acctcggatc aggtaggaat acccgtgaa
541 cttaagcata tca
```

Figura No10-A. *Colletotrichum gleosporioides*. Secuencia de ARN de 18S Ribosomal perteneciente a *Colletotrichum gleosporioides*. ACCESSION JQ366003.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/JQ366003.1>

```
1 cactaccgag tttcaactcc caaacccctg tgaacatacc tatakgttgc ctgcggcgat
61 cagcccgcgc cccgtaaaaa gggacggccc gcccggtggac ccctaaactc tgttttttagt
121 ggaccttctg agtaaaacaa acaataaat caaaactttc aacaacggat ctcttggttc
181 tggcatcgat gaagaacgca gcaaaatgag atatgtaatg tgaattgcag aattcagtg
241 atcatcgaat ctttgaacgc acattgcgcc cgccagtatt ctggcgggca tgctgttctg
301 agcgtcatta caaccctcaa gctcagcttg gtgttgggac tcgcggtaac ccgcgttccc
361 caaatcgatt ggcggtcacg tcgcagcttc atagcgtagt aatcatacac ctgcgttactg
421 gtaatcgtcg cggccacgcc gtaaaacccc aactctgaa tgttgacctc ggatcaggta
481 ggaataaccg ctgaacttaa gcatatcaat
```

Figura No10- B. *Fusarium oxysporum*. Secuencia de ARN de 18S Ribosomal perteneciente a *Fusarium oxysporum*. ACCESSION JQ946644.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/JQ946644.1>

10. Resultados.

Ubicación geográfica de los puntos de muestreo utilizando el sistema de geoposicionamiento global (GPS) y el tipo de microorganismo aislado. Los resultados se muestran la siguiente Tabla.

Tabla No 2. Resultados del muestreo por medio del GPS.

| Puntos de muestreo | Latitud | Longitud | Altitud / msnm | Microorganismo Aislados |
|--------------------|------------|------------|----------------|-------------------------|
| 1 | 19. 36941° | 102.38680° | 1290 | <i>Colletotrichum</i> |
| 2 | 19. 36924° | 102.28692° | 1295 | <i>Colletotrichum</i> |
| 3 | 19. 36906° | 102.38680° | 1296 | <i>Colletotrichum</i> |
| 4 | 19. 35429° | 102.29149° | 1303 | <i>Colletotrichum</i> |
| 5 | 19. 35234° | 102.28312° | 1327 | <i>Colletotrichum</i> |
| 6 | 19. 35003° | 102.27490° | 1349 | <i>Colletotrichum</i> |
| 7 | 19. 34816° | 102.25818° | 1434 | <i>Fusarium</i> |
| 8 | 19. 34809° | 102.25819° | 1437 | <i>Fusarium</i> |
| 9 | 19. 34763° | 102.25758° | 1460 | <i>Fusarium</i> |

10.1. Resultado del comparativo en aislado de la muestra de agente fitopatógeno del genero *Colletotrichum spp.*

Destacar que por medio de la modificación de medios de cultivo se obtuvieron resultados para la manipulación del agente fitopatógeno obsérvese la figura No 11.

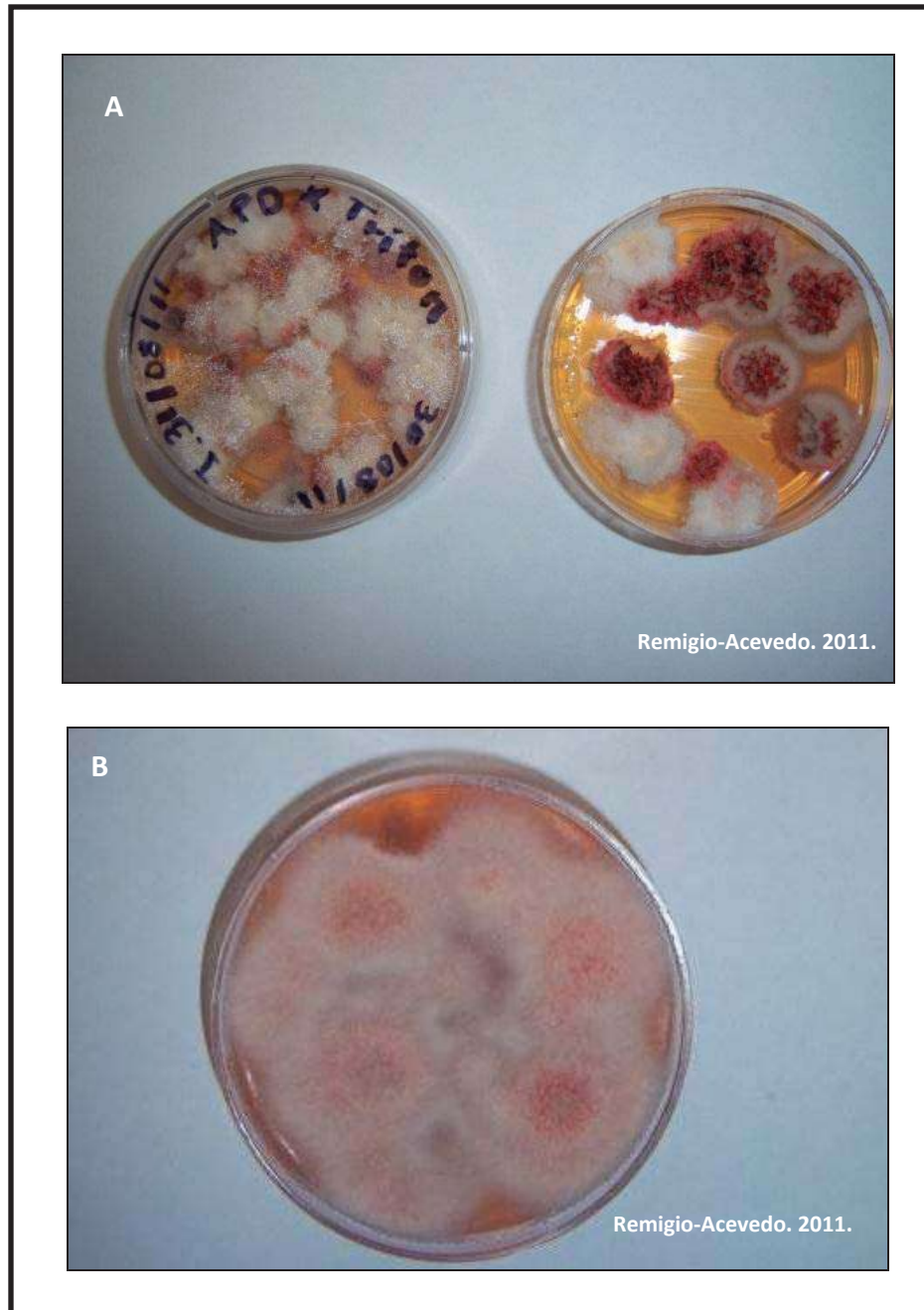


Figura No 11. comparativo para aislamiento del organismo fitopatogeno, como podemos observar en la figura ubicada en la parte superior (A) al agregar a nuestro medio el *tritón x 100* obtuvimos colonias aisladas al impedir el crecimiento radial caso contrario a lo observamos en la figura de la parte inferior (B) (Remigio-Acevedo.2011).

10.2 Resultados obtenidos de la identificación y caracterización del agente fitopatogeno *Colletotrichum spp* por medio de la metodología clásica.

Dentro de los siguientes resultados obtenidos se debe entender por método clásico, a la utilización en el aislamiento del agente mediante medios de cultivos, así como de su identificación mediante datos obtenidos de la morfología colonial de los mismos destacar que por medio de la modificación de medios de aislamiento para evitar el crecimiento radial la operación de identificación se facilita observar la figura No 11.

Por otro lado se recurre para obtener un testimonio mas adecuado ala técnica microscópica con tinción de tipo simple con azul de metileno, GRAM, entre otras, las cuales arrojan una morfología la cual sirve para comparar de una forma mas acertada en cuanto alas partes mas representativas del hongo (conidios, conidióforos, hifas etc.).

Lo cual nos lleva a los siguientes resultados que se exponen el la tabla No 3 en la cual se presentan los resultados obtenidos de del aislamiento e identificación del agente fitopatogeno mediante diferentes medios de cultivo como fueron APD y YPG (solido y liquido) como se muestra a continuación.

Tabla No 3. Resultados de la morfología colonial de *Colletotrichum spp* obtenida mediante medios APD y YPG (*resultado obtenido al analizar el fruto, **resultado obtenido al analizar el medio).

| Características morfológicas. | Presenta. | Coloración / aspecto. |
|--------------------------------------|------------------|------------------------------|
| Acervulo.* | No presenta. | ----- |
| Micelio aéreo** | Si presenta. | Blanquecino a marrón. |
| Textura** | Si presenta. | Algodonosa blanquecino. |
| Forma** | Si presenta. | Irregular. |

Tomando los resultados anteriores respecto a la morfología colonial obtenida mediante su identificación y aislamiento mediante los diversos medio de cultivo, se procedió a corroborar el resultado mediante la obtención de resultados de tipo microbiológico es decir morfología microbiológica evaluando sus principales características respecto a su 'presencia y aspecto dentro de la muestra analizada.

Los cuales arrojaron los siguientes resultados respecto a las características principales del agente fitopatogeno en cuestión observar la tabla No 4.

Tabla No 4. Resultados de la morfología microscópica de *Colletotrichum spp* mediante una tinción simple, observadas a 40x y 100x de muestra obtenida mediante medios APD y YPG

| Características morfológicas. | Presenta. | Coloración / aspecto. |
|--------------------------------------|------------------|--|
| Conidios. | Si presenta. | Ligeramente curvos, de ovalados a redondeados. |
| Conidióforos. | Si presenta. | Rectos y cortos. |
| Hifas. | Si presenta. | Hialinas, generativas septadas. |
| Septos. | Si presenta. | ----- |

10.3 Resultados obtenidos de la identificación y caracterización del agente fitopatógeno *Colletotrichum spp* por medio de métodos moleculares.

Resumiendo en los apartados anteriores punto 10.1 y 10.2 pudimos observar el aislado, extracción así como la identificación por método clásico con la que cuenta nuestro agente fitopatógeno conocido como *Colletotrichum spp*, ahora bien conociendo lo anterior utilizamos las muestra purificadas de nuestros aislados para elaborar métodos que nos relévele la especie de dicho agente mediante la aplicación de métodos propios de la biología molecular métodos modernos.

Como primer paso realizar la extracción de ácidos nucleicos de dicho agente, tomemos en cuenta que para este tipo de prácticas hay destacar que hay una extensa así como diversa metodología la cual puede seguirse.

Es importante mencionar que el proceso de extracción de ácidos nucleicos citado en el presente trabajo se realizo utilizando un equipo de nueva generación para extracción perteneciente a ZYMO RESEARCH (ZR Fungal / Bacterial DNA MiniPrep) biosistemas avanzados S.A. de CV.

Básicamente este equipo está basado en un modelo de elución así como intercambio iónico, por medio del mismo se obtuvieron buenos resultados respecto a la purificación de los ácidos nucleicos así como de una buena concentración la cual fue obtenida mediante el uso de técnicas estofotometricas a absorbencias de 260 y 280 nanómetros (nm) para esto a continuación se muestra la Tabla No 5 referente a las concentraciones obtenidas mediante este nuevo equipo, recordar para ello se llevo a cabo una técnica espectrofotométrica la cual tiene como base 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. Obsérvese el apartado 9.4.4 del apartado de material y métodos.

Por otro lado tenemos que no solo las cifras pueden convencer de que dicha concentración este hay por ello hay que comprobar que realmente obtuvimos el acido nucleico para ello se dio a la tarea de por medio de técnica de electroforesis elaborar un gel de integridad y correr nuestras muestras obtenidas contra un marcador de peso molecular para verificar la existencia de dicho acido nucleico.

Después realizar la técnica electroforética tenemos como resultado que la extracción hablando de la concentración obtenida es óptima mediante la metodología y hablando cualitativamente la presencia de los ácidos nucleicos también es positiva y óptima como lo observamos en figura 19 correspondiente a el apartado de resultados.

Tabla No 5. Lecturas espectrofotométricas de la extracción de ácidos nucleicos. Esta tabla representa las concentraciones obtenidas de material genético al término de la técnica de extracción de ácidos nucleicos, en la cual se observa una optima extracción en términos cuantitativos.

| Concentración obtenida de ácidos nucleicos. | | | | |
|--|-------------------|-------------------|--|-----------------------|
| Muestra. | Abs 260nm. | Abs 280nm. | Coefficiente de relación (260nm/280nm). | Concentración. |
| 1 | 0.023 | 0.012 | 1.84 | 0.851 µg/µl |
| 2 | 0.011 | 0.007 | 1.6 | 0.407 µg/µl |
| 3 | 0.018 | 0.013 | 1.4 | 0.481 µg/µl |

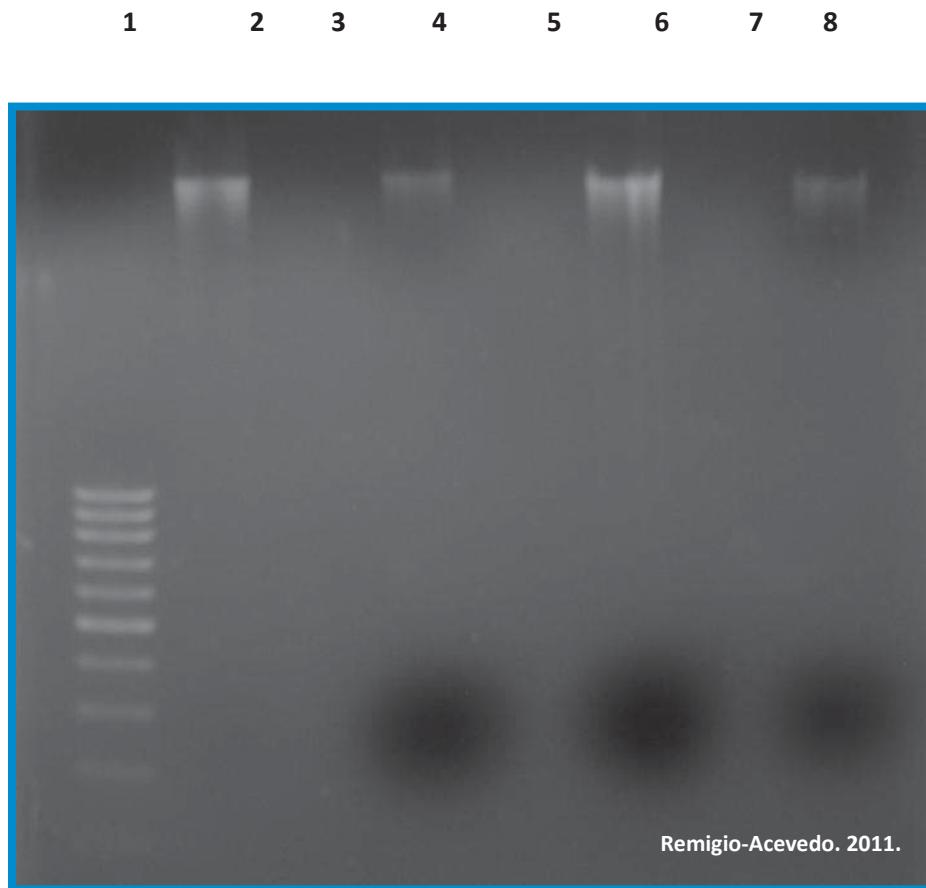


Figura No 12. Gel de Integridad del material genético (ADN) proveniente de las muestras aisladas de los fitopatógenos fúngicos. Carriles: 1.- Marcador molecular de 100 pb., 2.- ADN de aislado 1 de *Colletotrichum spp.*, 3.- Control negativo, 4.- ADN de aislado 2 de *Colletotrichum spp.*, 5.- Control negativo, 6.- ADN de aislado 1 de *Fusarium sp.*, 7.- Control Negativo, 8.- ADN de aislado 2 de *Fusarium sp* (Remigio-Acevedo. 2011).

1 2 3 4 5

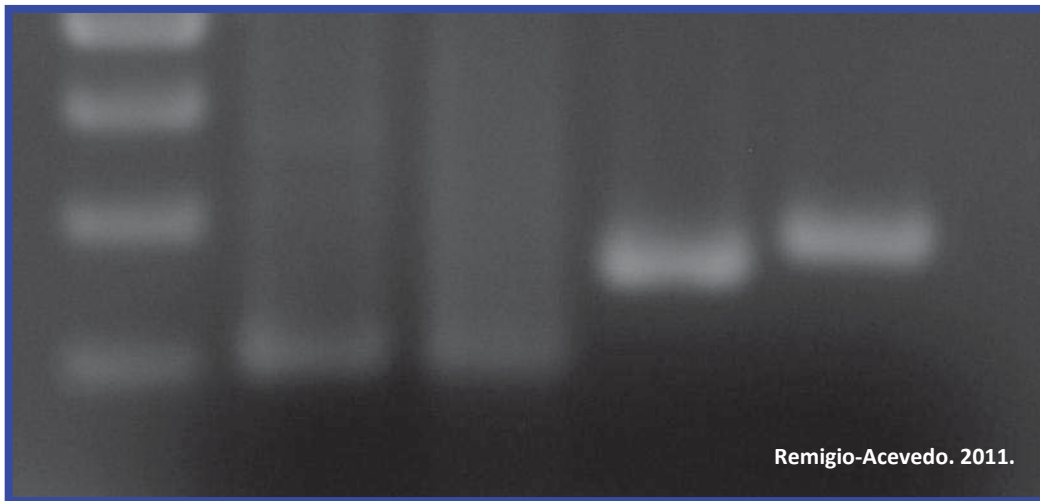


Figura No 13. Correspondiente a la PCR de los agentes fitopatógenos: 1) Marcador de tamaños moleculares en pares de bases (100pb), 2) cepa C1 *Colletotrichum gloeosporioides* (210pb), 3) cepa C2 *Colletotrichum gloeosporioides* (210pb), 4) cepa F1 *Fusarium oxysporum* (260pb), 5) cepa F2 *fusarium oxysporum* (260pb). (Remigio-Acevedo. 2011).

10.4 Resultados obtenidos del método medio mínimo inhibitorio (MIC's.) respecto a la resistencia con la que cuentan *Colletotrichum spp* ante un antifungico.

10.4.1 Resultados obtenidos del método placa MIC's.

En este apartado se reportan los resultados obtenidos al utilizar el *oxicloruro de cobre* como antifungico utilizado en los MIC's. En busca de encontrar resultados que arrojen un testimonio si hay o no una resistencia al antifungico, así como a que tipo de resistencia nos enfrentamos para ello se pueden observar dos resultados que nos sirven como comparativo entre si mismos medio APD + Oxicloruro de cobre y YPG + Oxicloruro de cobre:

Tabla No 6. Concentraciones de antifungico en la elaboración de MIC's método placa.

| YPG y APD + Oxicloruro de cobre | | | | |
|--|--------------|---------------------------|---------------------|--------------------|
| Etiqueta. | Conc. | Relación peso/vol. | Crecimiento. | Inhibición. |
| APD 1 | 1% | 1gr/100ml | ----- | positivo |
| APD2 | 0.5% | 0.5gr/100ml | escaso | NEGATIVO |
| APD3 | 0.1% | 0.1gr/10ml | abundante | negativo |
| APD4 | 0.05% | 0.05gr/100ml | abundante | negativo |
| Etiqueta. | Conc. | Relación peso/vol. | Crecimiento. | Inhibición. |
| YPG1 | 1% | 1gr/100ml | ----- | positivo |
| YPG2 | 0.5% | 0.5gr/100ml | escaso | NEGATIVO |
| YPG3 | 0.1% | 0.1gr/10ml | abundante | negativo |
| YPG4 | 0.05% | 0.05gr/100ml | abundante | negativo |

A continuación se muestran imágenes obtenidas para evaluación y criterio de resultados estos tienen relación directa con los resultados expuestos en la anterior tabla:

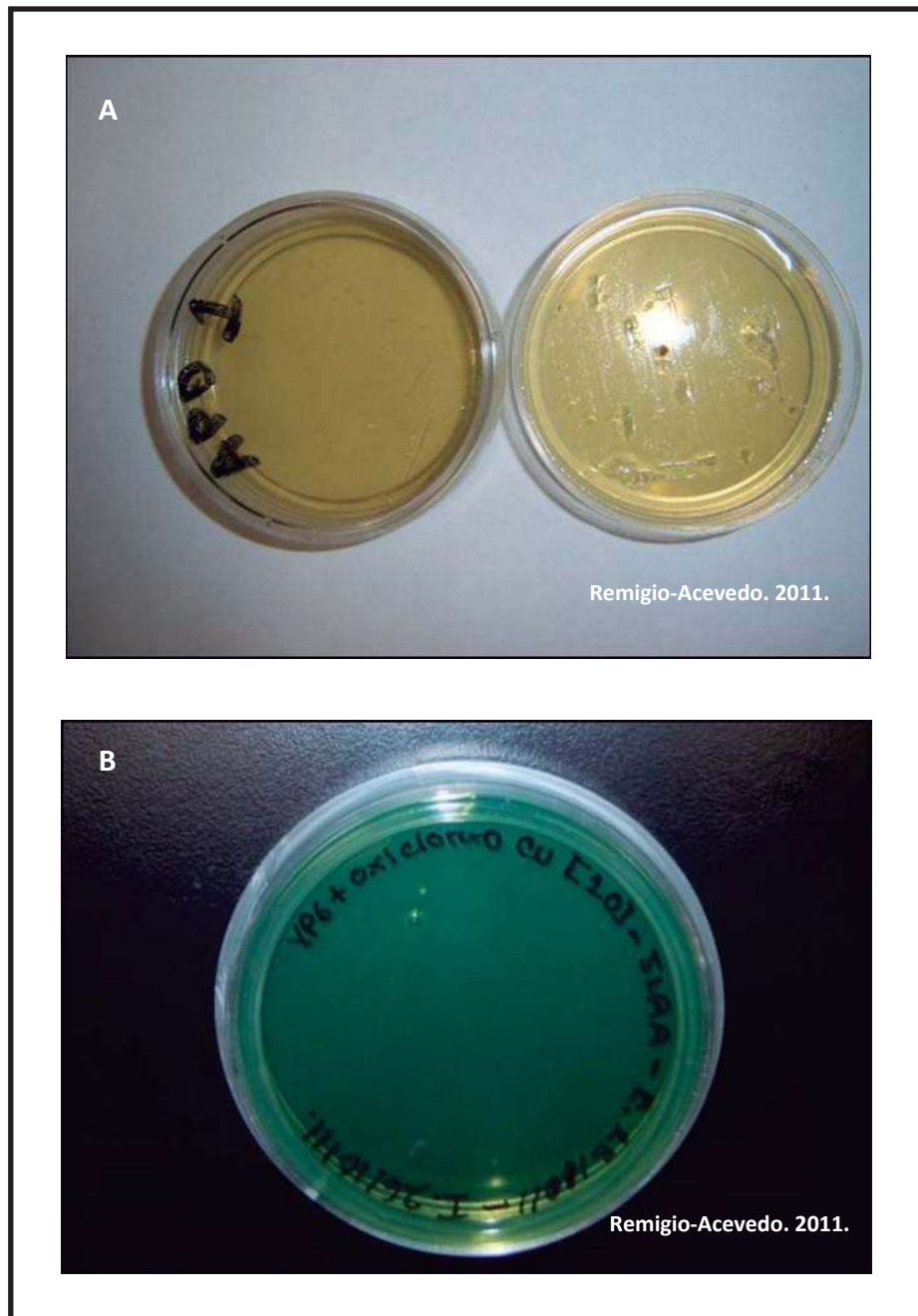


Figura No 14. Referente a la concentración del 1%: en estas imágenes se puede observar que tanto en la correspondiente al medio APD modificado (A) así como la correspondiente al medio YPG modificado (B) observamos una inhibición total de nuestro agente fitopatógeno (*Colletotrichum spp*), por lo tanto asumimos que el agente fitopatógeno es susceptible a nuestro antifungico a una concentración de 1% (Remigio-Acevedo.2011).

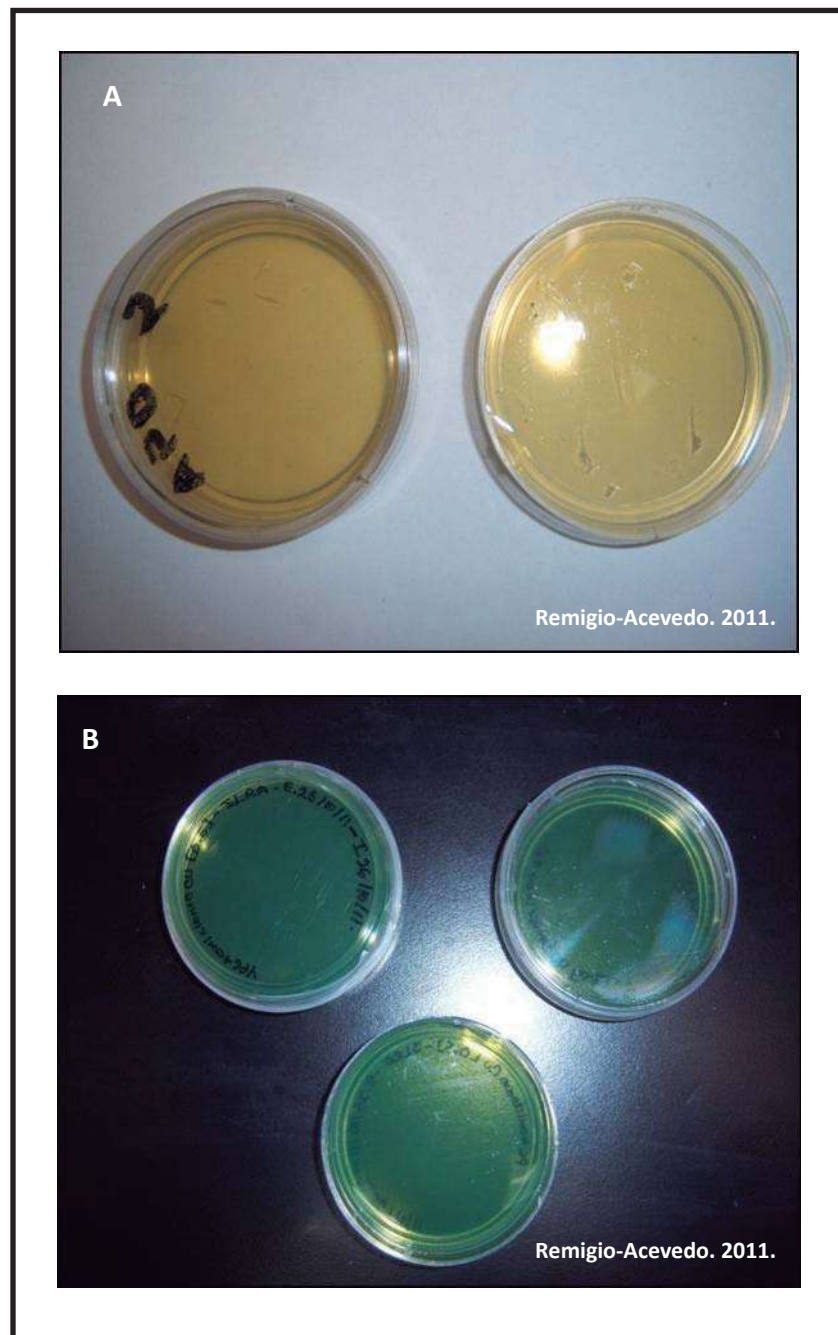
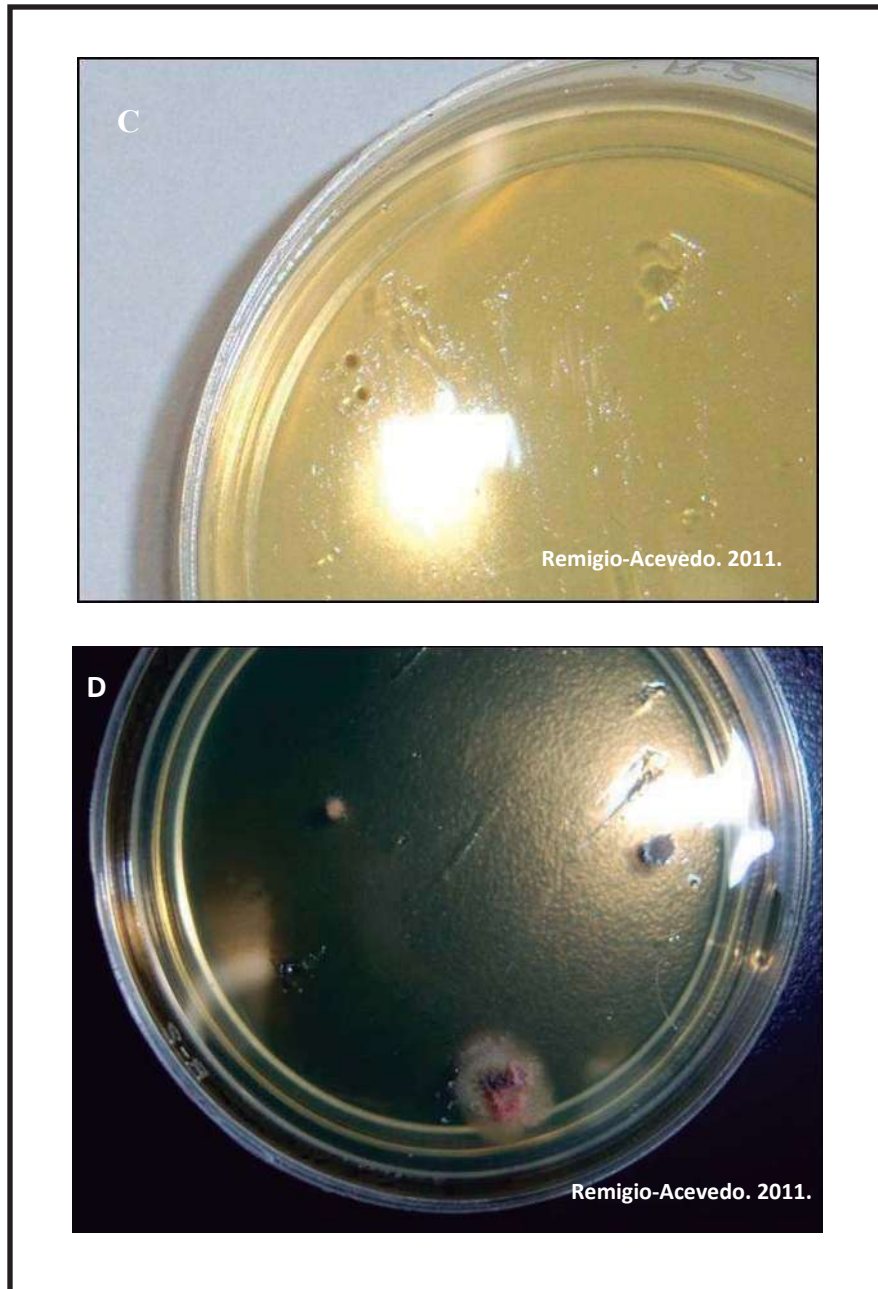


Figura No 15. Referente a la concentración del 0.5%: las siguientes imágenes marcan un punto importante para el desarrollo de nuestra posterior experimentación, ya que las colonias obtenidas a esta misma concentración marcan una resistencia ya comprobada, como se observa son pocas por ello procedimos a resembrar en medios sin modificar para un posterior análisis molecular (Remigio-Acevedo.2011).



Continuación de la figura No 15. Referente a la concentración del 0.5% método MIC's placa. Destacar que hasta el momento en ambos MIC's tanto modificación APD (A y C) como YPG (B Y D) arrojan resultados similares, esto no quiere decir que este en su totalidad comprobada la resistencia expresada de nuestro agente fitopatógeno, por ello se procederá a nuevas técnicas de elaboración de MIC's para corroborar resultados (Remigio-Acevedo. 2011).

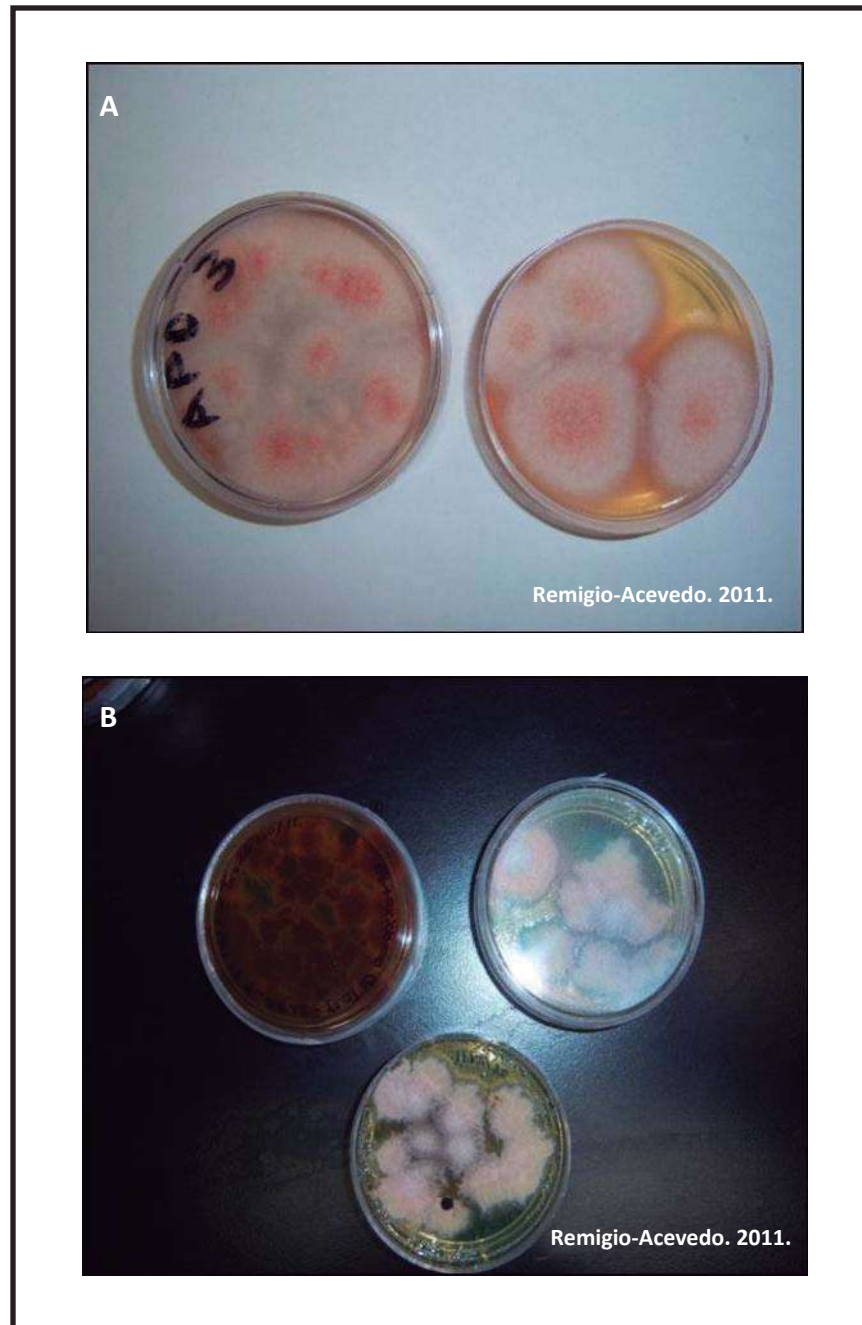
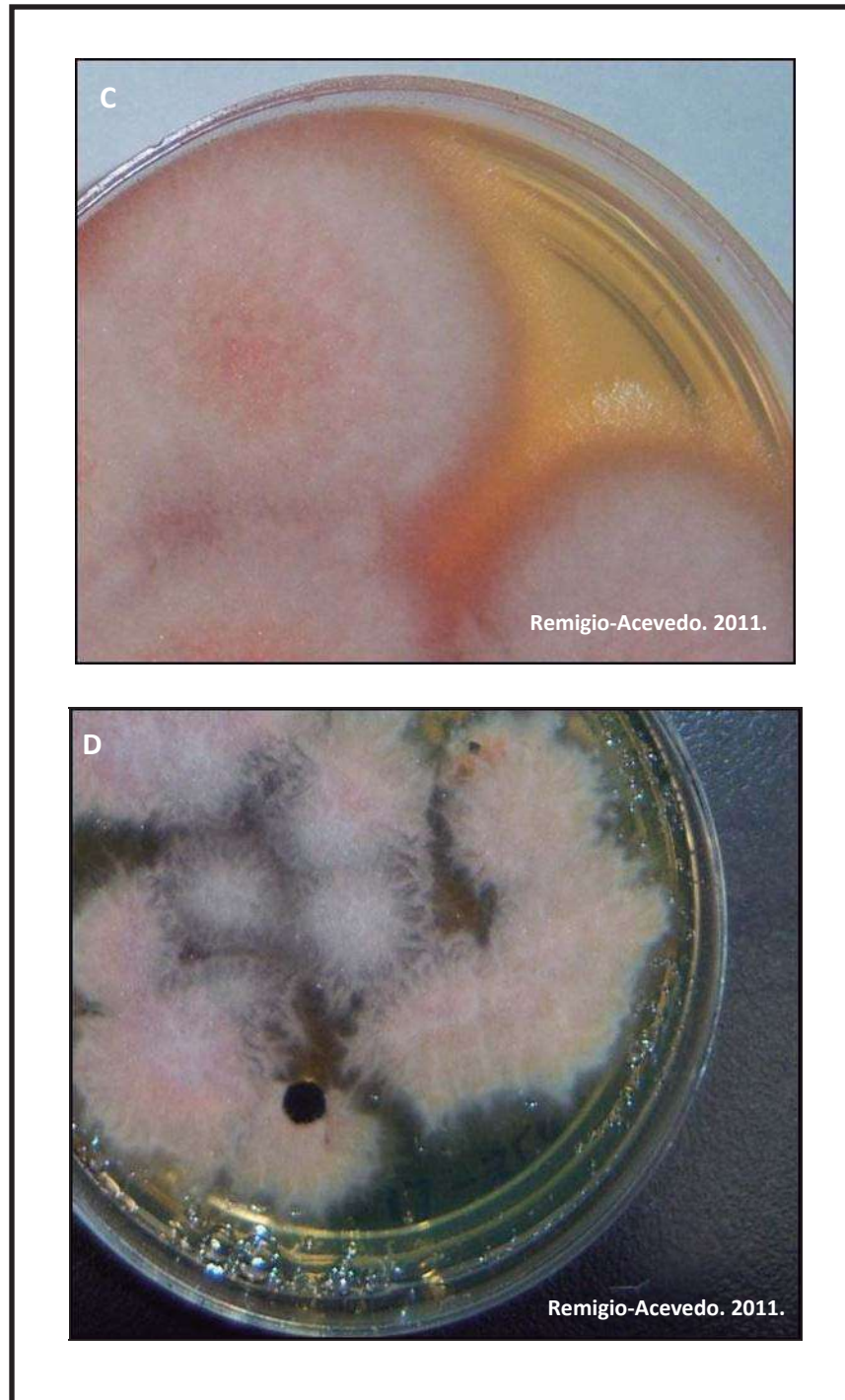


Figura No 16. Referente a la concentración del 0.1%: las siguientes imágenes nos muestran que nuestro MIC's a una concentración de 0.1% no es suficiente para la inhibición de nuestro agente fitopatógeno, podemos observar un abundante crecimiento de nuestro agente fitopatógeno en este caso como lo marca nuestra tabla de resultados y concentraciones N°1 (Remigio-Acevedo. 2011).



Continuación de la figura No 16. Referente a la concentración del 0.1% método MIC's placa. Observarse que aun cuando la morfología colonial de un medio a otro es un tanto diferente, se trata del mismo organismo fitopatógeno para ambos casos tanto C como D.

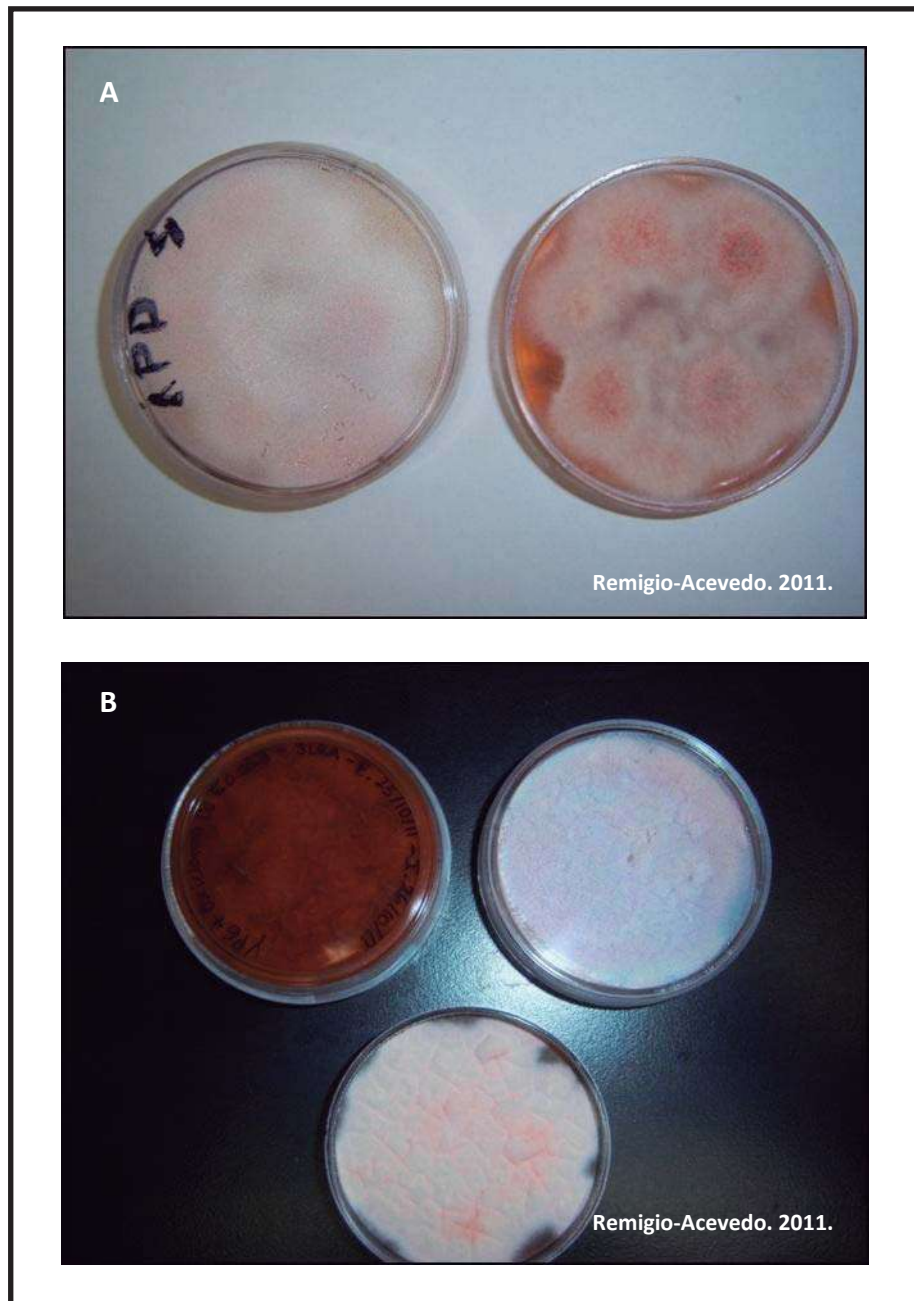


Figura No 17. Referente a la concentración del 0.05%: en las imágenes que a continuación se muestran tiene un resultado negativo en cuanto a inhibición del agente fitopatógeno. Este tipo de antracnosis es difícil de erradicar y como se menciona es una concentración muy pequeña de antifúngico incorporado a nuestros MIC's para esperar un resultado de inhibición (APD A : YPG B) (Remigio-Acevedo. 2011).

10.4.2 Resultados obtenidos del método líquido /agitación constante para MIC's.

Retomando como se menciona en **Figura No. 15 y su continuación** referente a la **concentración del 0.5%** se utilizo en método MIC's en placa pero estos resultados deben ser corroborados por ello se realizo una técnica diferente de MIC's el cual es utilizando un medio liquido modificado más un antifungico en este caso utilizamos el medio YPG liquido + oxiclورو de cobre aplicando agitación continua durante todo de incubación obtuvimos los siguientes resultados.

Tabla No 7. Concentraciones de antifungico en la elaboración de MIC's método liquido/agitación constante.

| YPG liquido + oxiclورو de cobre | | | | |
|--|-------|--------------------|--------------|-------------|
| Etiqueta | Conc. | Relación peso/vol. | Crecimiento. | Inhibición. |
| YPG1 | 1% | 1gr/100ml | ----- | positivo |
| YPG2 | 0.5% | 0.5gr/100ml | escaso | NEGATIVO |
| YPG3 | 0.1% | 0.1gr/10ml | abundante | negativo |
| YPG4 | 0.05% | 0.05gr/100ml | abundante | negativo |

Tabla No 8. Resultados comparativo sobre la inhibición de los diferentes métodos MIC's

| Resultados obtenidos sobre la inhibición. | | | | | |
|--|-----------|-------|--------------------|--------------|-------------|
| Estado. | Etiqueta. | Conc. | Relación peso/vol. | Crecimiento. | Inhibición. |
| SOLIDO | APD2 | 0.5% | 0.5gr/100ml | escaso | NEGATIVO |
| SOLIDO | YPG2 | 0.5% | 0.5gr/100ml | escaso | NEGATIVO |
| LIQUIDO | YPG2 | 0.5% | 0.5gr/100ml | escaso | NEGATIVO |

A continuación se muestran imágenes obtenidas para evaluación y criterio de resultados estos tienen relación directa con los resultados expuestos en la anterior tabla:

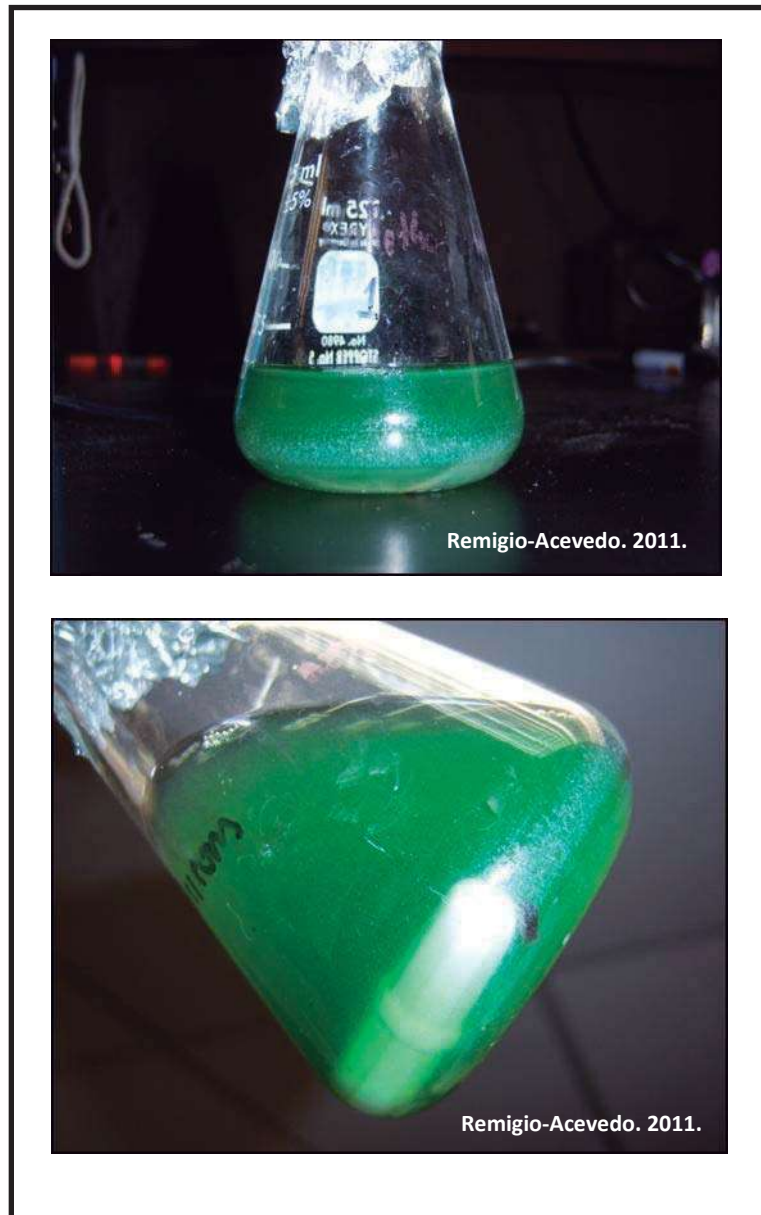


Figura No 18. Referente a la concentración del 1%: aquí podemos observar una inhibición completa al no encontrar testigo alguno de micelio en nuestro medio, esto en comparación con nuestro MIC's placa tenemos un resultado de una inhibición total a una concentración de 1% en ambos métodos MIC's (Remigio-Acevedo. 2011).

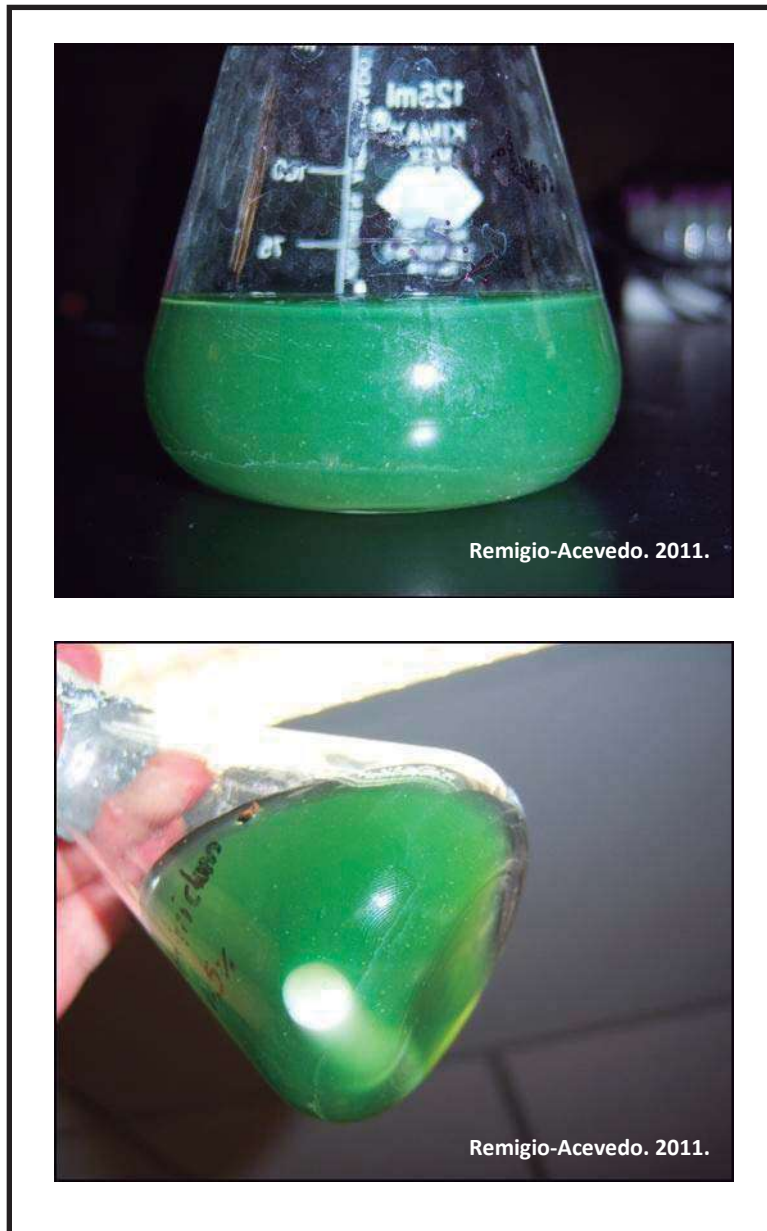


Figura No 19. Referente a la concentración del 0.5%: como lo mencionamos en secciones pasadas el resultado obtenido tanto en nuestro MIC's placa como liquido con agitación constante dan un resultado similar, de aquí podemos establecer un limite al cual se sabe de una resistencia al antifungico la cual podemos clasificar ahora y decir que nuestro agente fitopatógeno tiene una resistencia a la que denominamos de tipo heterologo (Remigio-Acevedo. 2011).

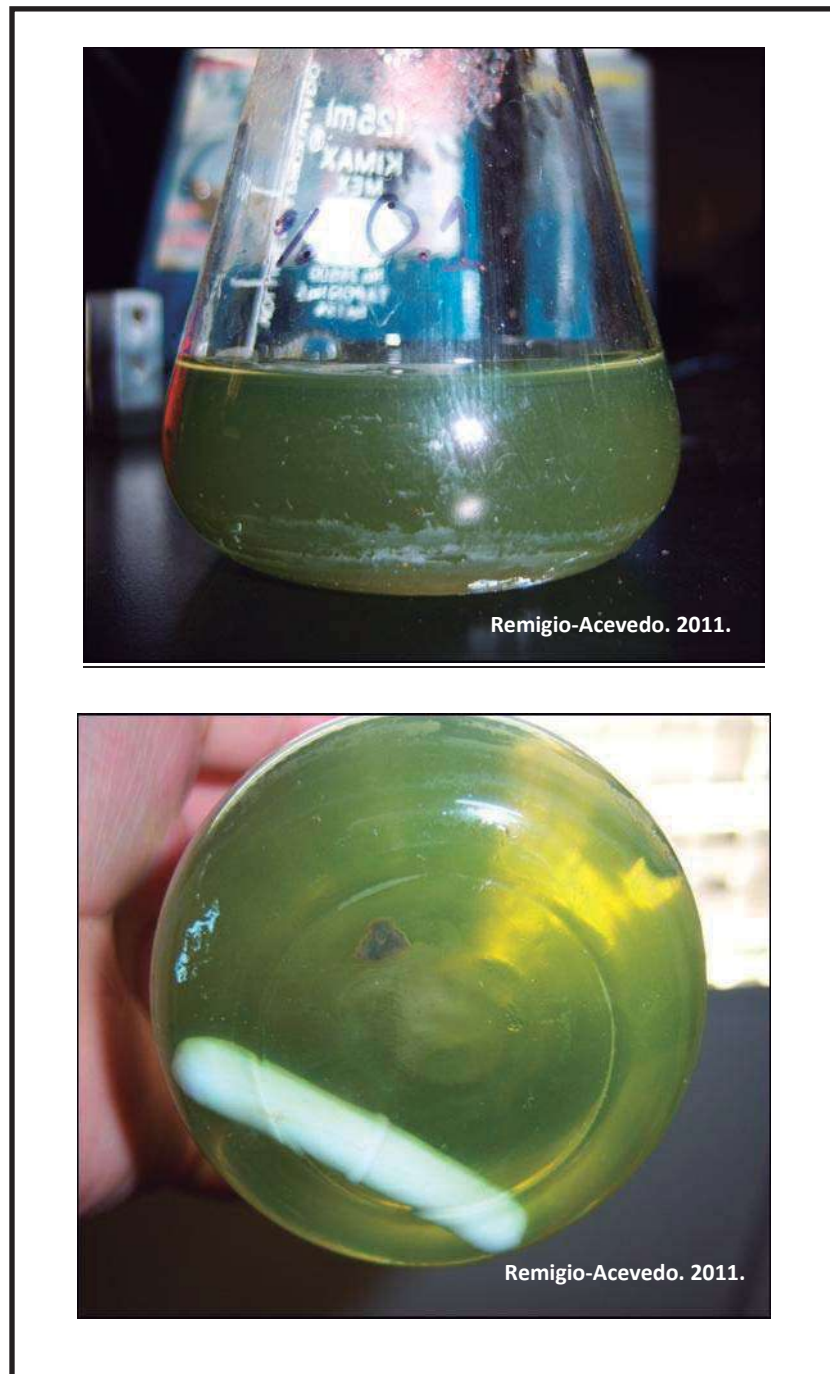


Figura No 20. Referente a la concentración del 0.1%: en la siguiente imagen podemos observar al igual que en nuestros MIC's placa correspondientes a esta misma concentración crecimiento abundante de nuestro agente fitopatógeno (Remigio-Acevedo. 2011).

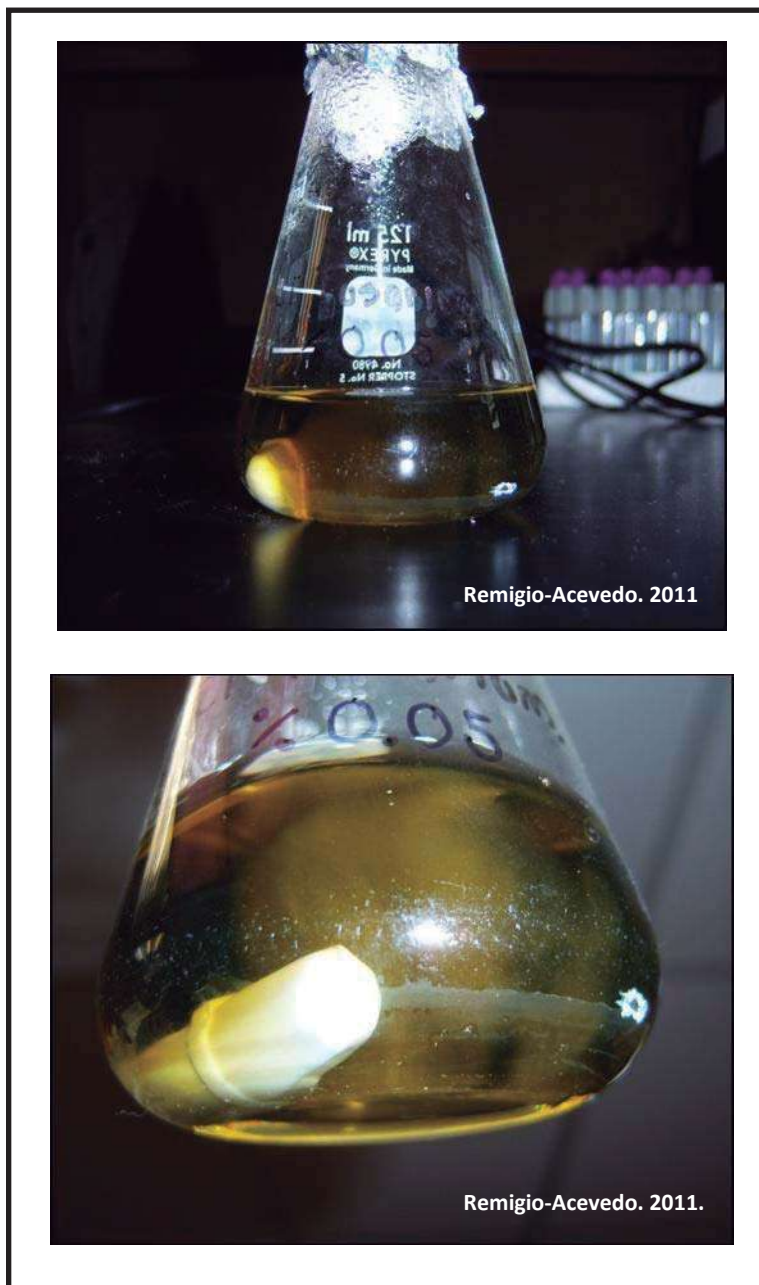


Figura No 21. Referente a la concentración del 0.05%: en la siguiente imagen podemos observar al igual que en nuestros MIC's placa correspondientes a esta misma concentración crecimiento abundante de nuestro agente fitopatogéno, esto debido a que igual que en el MIC's placa la concentración de nuestro antifungico es muy pequeña para inhibir a nuestro agente fitopatogéno (Remigio-Acevedo. 2011).

11. Discusión.

En el presente trabajo se presentaron diversos resultados de los cuales podemos destacar los siguientes como son:

- Aislamiento del agente fitopatógeno conocido como *Colletotrichum spp.* agente causal de antracnosis en gran diversidad de cultivos de tipo subtropical papaya, el plátano, entre los principales en donde no se ha mostrado con anterioridad evidencias de su presencia en el cultivo de *Rubus spp.* (Lucia Afanador-Kafuri, et al 2003) esto queda demostrado a través del aislamiento del microorganismo por medio de métodos clásicos, medios selectivos usados en micología y corroborado a través de herramientas moleculares como lo es la PCR.
- Adicionalmente se trabajo con la ubicación de puntos de muestro a través del geoposicionamiento global (GPS) lo que permite identificar el punto exacto de muestreo y por lo tanto el sitio o nicho ecológico en el cual se encuentra el fitopatógeno *Colletotrichum spp* delimitando el área de estudio dentro de un espacio geográfico este tipo de conjunción metodológica y tecnológica es muy recientemente explotada por lo que la obtención de los datos aquí presentados son hito dentro del estudio integral de fitopatógenos a nivel mundial.
- De esta manera el aislamiento y caracterización del agente fitopatógeno (*Colletotrichum spp.*) en un nuevo hospedero del cual no hay datos actuales, lo cual puede ser explicado por lo reciente del cultivo en la región de los Reyes y que las variedades de *Rubus spp.* son de origen brasileño las cuales no son oriundas de la esta zona Michoacana, pero en donde si se encuentra una región productora de aguacate, que es en este caso la región de Peribán municipio adyacente a la zona productora de Zanzamoras en donde la explotación de aguacates en Peribán, (Medeiros, et al.,2010) conlleva la prevalencia de la antracnosis por *Colletotrichum spp.*, especulando la posibilidad del origen del *Colletotrichum spp.* aislado en la región de los Reyes en los cultivos de zanzamoras.

Continuando con lo anterior referente a los resultados obtenidos, diversas literaturas nos hablan del agente fitopatogeno *Colletotrichum sp* como el principal causal de antracnosis entre los hospederos que parten 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 (Hunter et al, 1972).

Estos resultados se obtuvieron por medio de técnicas clásicas (medios de cultivo selectivos) que parten desde su aislamiento en diversos medio de cultivo, así como de una minuciosa observación respecto a la anatomía de la planta y fruto donde se suele presentar la sintomatología clásica de antracnosis, en comparativa con otros hospederos se observan diferencias significativas como la ausencia de coloración en los acérvulos en *Rubus spp.* y la aparición de una coloración marron en acérvulos en otros hospederos respecto a sus frutos, esto se puede traducir en la expresión del agente fitopatogeno en una forma diferente de un hospedero a otro esto mediado por el conjunto de diversas moléculas constituyentes de hospedero.

Para ello se emplearon técnicas moleculares ya que hoy en día se conoce la secuencia de oligonucleótidos y la utilización de primers el agente fitopatogeno *Colletotrichum spp* lo cual nos permite realizar técnicas de PCR mediante muestras purificadas de ácidos nucleídos para corroborar su identificación (Santos, E.2009).

Como se observo en el presente trabajo la metodología clásica en conjunto con metodología molecular pueden ser la herramienta indicada para la construcción de bancos de datos que contengan información que facilite en una gran parte el trabajo de identificación no solo para el área de la industria frutícola si no la implementación en diversas áreas donde se requiera de la explotación de manera extensiva pero que la presencia de agentes fitopatogeno pueda limitar su desarrollo económico, por la presencia de microorganismos provenientes de otros cultivos ya explotados con anterioridad.

12. Conclusiones.

El presente trabajo muestra que la exactitud y precisión actual de las técnicas de recolección de muestras para su estudio en el laboratorio han aumentado a través de la utilización del geoposicionamiento global (GPS), y la conjunción de herramientas moleculares encaminadas a la identificación de fitopatógenos en cultivos de interés comercial permite generar bases de datos que ayudan a los productores y comercializadores tomar decisiones con un sustento científico y de esta manera posicionar a este sector agroindustrial dentro de la innovación agrícola mundial.

13. Perspectivas.

Se propone ampliar el área de estudio del municipio de los Reyes de Salgado de Michoacán e incluir los municipios productores de frutillas rojas como lo son Tocumbo, Periban y más recientemente el municipio de Ziracuaretiro.

Adicionalmente se considera utilizar RT-PCR en tiempo real para valorar la expresión de genes implicados en la virulencia de las especies de *Colletotrichum gleosporioides*.

Generar bancos de datos de la diversidad biológica que incluye el tipo de microorganismo fitopatogeno asociado al cultivo *Rubus spp.* y la actualización de los puntos geográficos.

14. Glosario.

Acérvulo: consiste en un estrato plano en forma de platillo formado por conidióforos por lo general cortos, que crecen juntos y que surgen de una masa más o menos estomática de hifas.

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 timina y la citosina.

Acido 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).

Antibiograma: método que se basa en la formación de halos de inhibición del crecimiento en una placa inoculada homogéneamente por acción de discos antibióticos de concentración conocida, la difusión de este hacia el medio va a originar la inhibición del crecimiento.

Antifungico: se entiende por antifungico o antimicótico a toda sustancia que tiene la capacidad de evitar el crecimiento de algunos tipos de hongos o incluso de provocar su muerte.

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.

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

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

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.

Fungicidas: son sustancias tóxicas que se emplean para impedir el crecimiento de matar los hongos y mohos perjudiciales para las plantas, los animales o el hombre.

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

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 esta refiriendo al estudio de las formas externas de un objeto de estudio.

Mutagenicidad: 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.

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 flanquean te de la región que se quiere amplificar, estos actúan como cebadores para la síntesis de ADN in vitro, la cual esta catalizada por la Taq polimerasa, los primers actúan como marcadores del sitio de inicio de la enzima.

Queratomicosis: 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 amplicon, con la capacidad informacional.

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.

15. Bibliografía.

1. 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.
2. Alconada T.M., Martinez M.J. 1995. Isolation protoplasts from vegetable tissus using extracellular lytic enzymes from *Fusarium oxysporum* f. sp. *Rev Argent Microbiol.*; 27:191-7.
3. Bartnicki-Garcia S., Nickerson W.J. 1962. Nutrition, growth, and morphogenesis of *Mucor rouxii*.
4. Benhamou N., Chamberland H., Pauze F.J. 1990. Implication of pectic components in cells surface interactions between tomato root cell sand *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Plant Physiol.*; 92: 995-1003.
5. 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. Fecha de consulta: 30/11/2010. Hospedero: Tomate.
6. Burger, de 1921. . Las variaciones en *Colletotrichum gloeosporioides*. *J. Agric. Res.* 20:723-735.
7. 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.

8. 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.
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.
10. Dickman, MB, Patil, SS, y Kolattukudy, PE 1982. La infección latente de la papaya causada por *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Dis.* 67:748-750.
11. 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.
12. 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).
13. 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.
14. 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.

15. Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. Brock., Biología de los microorganismos. Octava edición. Prentice Hall Iberia. Madrid; 2000;155.
16. Mathews, C. K., Van Holde, K. E. & Ahern, K. G. 2003, Bioquímica, 3 edición, pp.204. ISBN 84-7892-053-2.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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
21. 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.
22. Trujillo, E.E., y Obrero, F.P. 1969. La antracnosis de la papaya hojas causada por *Colletotrichum gloeosporioides* Plant Dis. Rep. 53:323-325.

23. 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.

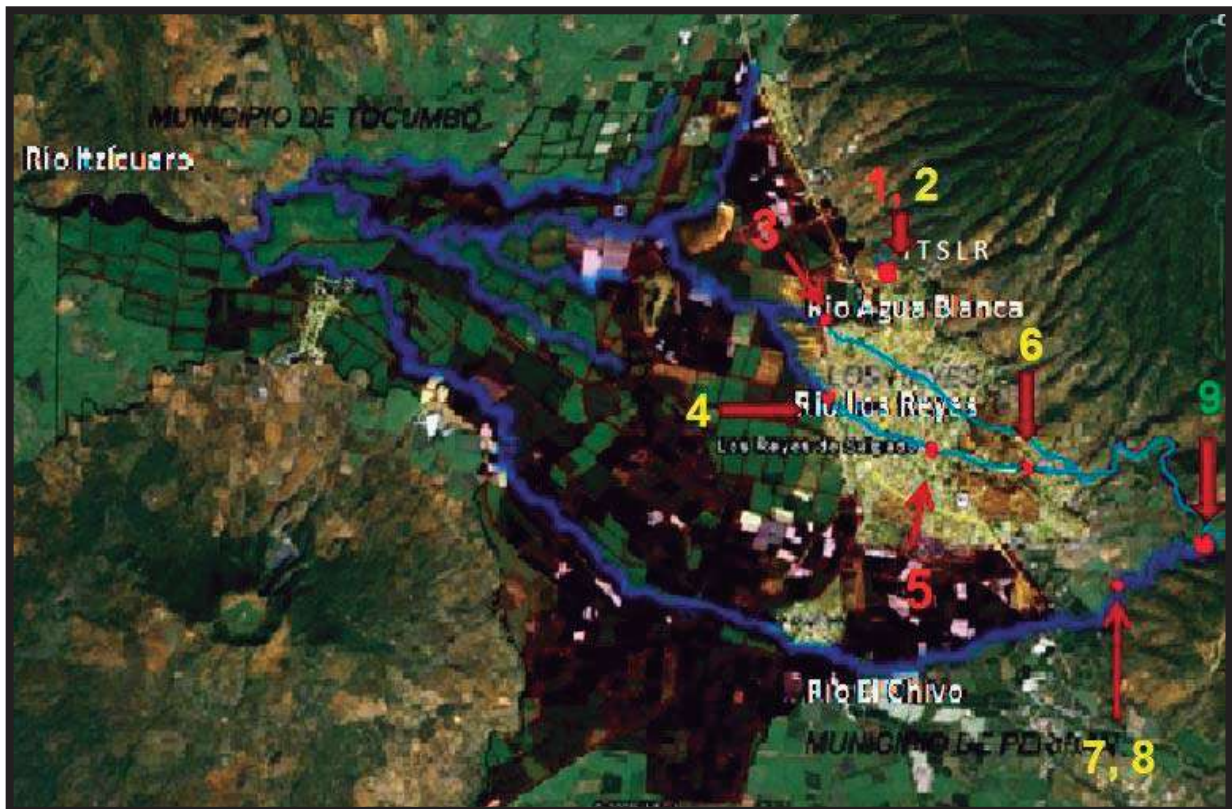
SITIOS WEB CONSULTADOS.

24. The University of Adelaide, mycology online. Copyright © 2012 The University of Adelaide, last modified 03/Enero/2012, David Ellis, cricos provider number 00123M. *Colletotrichum coccodes*. Acceso 30/ Enero/2012. http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Coelomycetes/Colletotrichum).
25. 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>.
26. El sol de Morelia, Silvia Hernández González. © El sol de Morelia 5 de mayo 2010. Se fortalece la producción de zarzamora en michoacan. Acceso 18/Noviembre/2011. <http://www.oem.com.mx/elsoldemorelia/notas/n1621436.htm>.
27. Santos, E. PCR y Diagnostico Molecular. Madrid España. © Lifescienciendceslab enero-febrero 2009. Acceso 12/Diciembre/2011. <http://www.lifesciencienciaslab.com>.
28. 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>).
29. GEFOR, galería de imágenes © GEFOR junio 2011. *Fusarium oxysporum*. Acceso 30/ Enero/2011. <http://www.gefor.4t.com/hongos/fusariumoxysporum.html>.

16. Anexos.

Anexo No 1. Mapeo GPS puntos clave de recolección.

Mapa de la ubicación de los puntos geográficos en donde se realizó el muestreo, para el aislamiento y caracterización de *Colletotrichum spp.* reportado en la tabla No. 2 del apartado perteneciente a resultados.



Anexo No 2. Extracción de ácidos nucleicos (traducción).

Traducción de la metodología para la extracción de ácidos nucleicos mediante un equipo de nueva generación para extracción perteneciente a ZYMO RESEARCH (ZR Fungal / Bacterial DNA MiniPrep) biosistemas avanzados S.A. de CV.

1. Colocar en un tubo eppendorf 200 μ l de sol. PBS y agregar de 50 a 100 mg de micelio para suspensión de la muestra.

NOTA: de ser necesario utilizar vortex por un lapso de 2 minutos para la resuspension.

2. Una vez resuspendido el micelio transferirlo a un primer tubo el cual contiene pequeñas perlas de porcelana las cuales ayudaran a la lisis para extracción de nuestro ácidos nucleicos (Bashing Bead Lysis tube), agregar 750 μ l de sol. Para lisis (Lysis Solution), llevar a vortex (vel. Máxima lapsos de 1min a 40seg hasta sumatoria de 5 min).
3. Llevar a microcentrifuga a 10,000 rpm por un lapso de 1 min.
4. Colocar en un tubo de tapa naranja (Zymo - Spin IV Spin Filter) 400 μ l del sobrenadante obtenido de nuestro anterior tubo, llevar a microcentrifuga a 7,000 rpm por un lapso de 1min.

NOTA: recordar quebrar la punta de la parte del filtro antes de realizar el proceso de transferencia.

5. Una vez terminado en tiempo de centrifugado retirar la parte superior de tubo (tapa naranja solo el filtro) y a la parte inferior donde tenemos el fluido agregamos 1,200 μ l de buffer para precipitación (Basal Fungal/Bacterial Binding Buffer) y mezclamos cuidadosamente.

C. En un tubo nuevo con filtro (Zymo - Spin IIC colum) procedemos a transferir 800 μ l de nuestra mezcla previa, llevar a microcentrifuga a 10,000 rpm por un lapso de 1 min., procedemos a desechar el liquido de la parte inferior.

D. Repetir el paso A.

6. En un nuevo tubo colector procedemos a colocar solo la parte superior (columna) de nuestro tubo utilizado en el apartado A del paso 5, procedemos a agregar 200 μ l buffer de pre lavado (DNA Pre - Wash Buffer), llevar a microcentrifuga a 10,000 rpm por un lapso de 1 min.
7. Agregar 500 μ l buffer de lavado (Fungal/Bacterial DNA Wash Buffer), llevar a microcentrifuga a 10,000 rpm por lapso de 1 min.
8. Transferir solo la columna de paso 7 a un tubo eppendorf y agregar 63 μ l el buffer de elución el cual nos servirá para recuperar nuestros ácidos nucleicos (DNA Elution Buffer).