

TEMA

**IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE
ESPECIES DE *FUSARIUM* EN PLANTAS DE
NOCHEBUENA**

OPCIÓN I

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO BIOQUIMICO

PRESENTA

ELIZABETH VERA ROMAN

TEHUACÁN, PUE.

SEPTIEMBRE 2013

DEPENDENCIA: División de Estudios Profesionales
OFICIO No.: 54/2013
ASUNTO: AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

Tehuacán, Pue., a **SEPTIEMBRE 12, 2013**

C. VERA ROMAN ELIZABETH
AREA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA
Presente

Por medio del presente, me estoy dirigiendo a usted para hacer de su conocimiento que los CC. Integrante de la Comisión Revisora del TRABAJO PROFESIONAL con el Tema:

**"IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE
ESPECIES DE FUSARIUM EN PLANTAS DE NOCHEBUENA"**

I.-TESIS PROFESIONAL

que usted realizó me han informado que ha sido **APROBADO**, por lo cual esta División, en cumplimiento de las facultades que le han sido conferidas en el Manual de Procedimientos Académicos Administrativos para el Sistema Nacional de Educación Superior Tecnológica, tiene a bien extenderle la **AUTORIZACIÓN** correspondiente para la impresión de dicho Trabajo.

Atentamente
"Excelencia en la Educación, Fortaleza del País"

CP. Renato Emilio Ortiz Saucedo
Jefe de la División de Estudios Profesionales



AGRADECIMIENTOS

Al proyecto FOMIX: Estudios Epidemiológicos de Enfermedades y Bioecología de Plagas en Cultivos de Importancia Económica en el Estado de Morelos, con clave: MOR-2010-C01-148902, financiado por los Fondos Mixtos del gobierno del estado de Morelos y el CONACYT por su apoyo en la realización de esta tesis.

Al Instituto Nacional de Investigaciones, forestales, agrícolas y pecuarias por abrirme sus puertas y por la oportunidad que me brindaron para desarrollarme en el ámbito profesional.

Al Dr. Sergio Ramírez Rojas gracias por los conocimientos compartidos, el apoyo, confianza, tiempo y atenciones brindados durante la realización de este trabajo.

A Katya Ornelas por su dirección, paciencia, tiempo y observaciones hechas en el desarrollo de esta investigación.

Agradezco a mi asesora la Q.B.P Luz Rosalía Mejía Arruel por su interés, confianza, sugerencias y observaciones en dicha investigación.

A mi consejo sinodal a la M.C. Lucila Juárez Mendoza, Ing. Nidia Esther Gómez Flores y a la Ing. Lucina Lilia Gómez Hernández, por todas las atenciones y observaciones en mi investigación.

A mis profesores que con sus conocimientos y experiencias ocupan un lugar en mi formación académica.

Agradezco al personal del laboratorio de fitopatología por el apoyo y colaboración brindados para la realización de este trabajo y por haber hecho agradable mi estancia.

DEDICATORIAS

En primer lugar a mi padre Dios, por todo el amor que a cada instante me da, porque sin él nada es posible ya que ningún plan está fuera de su alcance.

A mis padres porque son el mejor regalo que he recibido, con su ejemplo me han enseñado que todo lo que se quiere se logra, que no importan las circunstancias cuando lo que haces es por amor y hecho dedicación.

A mis hermanas por demostrarme que a su lado no exististe adversidad, porque son mi mayor motivación y muestra de amor.

A Gabriela, Susan, Eusebio y Yonathan por su amistad, confianza, y amor demostrados en todo momento, son un gran tesoro para mí.

Del hombre son los proyectos, su formulación viene del Señor.

(Prov 16,1)

RESUMEN IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE *FUSARIUM* EN PLANTAS DE NOCHEBUENA

La nochebuena (*Euphorbia pulcherrima*) perteneciente a la Familia Euphorbiaceae, es de origen mexicano y se cultivó desde la época de los aztecas, quienes la llamaron “Cuetlaxochitl”. Se convirtió en un símbolo de la navidad a partir del siglo XVIII en las fiestas del santo pesebre en Taxco, Guerrero.

La producción nacional de nochebuena es una actividad agrícola importante desde el punto de vista económico y social, a nivel mundial; México se ubica en la cuarta posición, con una superficie cultivada de 320 hectáreas y genera aproximadamente 3,200 empleos directos y alrededor de 9,600 indirectos; en Morelos existen 150 productores dedicados a esta actividad. En 2011 se cultivaron 14.5 millones de plantas; de dicha producción nacional 35% se obtuvo en Morelos, colocándolo como el estado de mayor producción de nochebuena en el país, con una producción de casi 5.1 millones de plantas anuales en promedio.

La producción se ve afectado por enfermedades del sistema radical, limitando la producción, más del 20 % de la nochebuena se pierde por el desarrollo de pudriciones causadas por *Fusarium* sp mismo que fue identificado morfológicamente por evaluación de sus estructuras morfológicas y molecularmente por PCR. Los síntomas de la enfermedad consisten en pérdida de turgencia en las hojas, marchitamiento, pudrición de tallo y raíz, ocasionando la muerte de la planta. El DNA se extrajo con DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). La identificación de *Fusarium oxysporum* por PCR e hizo con los oligos ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') Y ITS4 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')(White et al., 1990). La secuenciación se realizó siguiendo el método Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Fluorescence-Based Sequencing. La secuencia de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Melonis* (GenBank Acc. No. AY188919.1) Confirmó 99% de identidad con el gen de *Fusarium* sp. WF152 (GenBank Acc. No. HQ130708.1), previamente reportada.

ABSTRACT

The poinsettia (*Euphorbia pulcherrima*) belonging to the family Euphorbiaceae, is of Mexican origin and grown since the time of the Aztecs, who called it "Cuetlaxochitl". It became a symbol of Christmas from the eighteenth century the saint festivities manger in Taxco, Guerrero.

Domestic production of Christmas Eve is an important agricultural activity from the standpoint of economic and social, global, Mexico is in fourth place, with a cultivated area of 320 hectares and produces approximately 3,200 direct jobs and about 9,600 indirect; in Morelos there are 150 farmers engaged in this activity. In 2011, 14.5 million plants cultivated, of the national production 35% was obtained in Morelos, placing it as the largest state of poinsettia production in the country, producing nearly 5.1 million in average annual plants.

The production is affected by diseases of the root system, limiting production, over 20% of the poinsettia is lost by the development of rot caused by *Fusarium* sp. same as was identified morphologically by assessing morphological and molecular structures by PCR. Symptoms of the disease include loss of turgor on the leaves, wilting, root and stalk rot, killing the plant. DNA was extracted with the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). *Fusarium oxysporum* identifying and made by PCR with the primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS4 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') (White et al., 1990). Sequencing was performed using the method Taq Dye Terminator Cycle Sequencing FS Fluorescence-Based Sequencing. The sequence of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (GenBank Acc No. AY188919.1) confirmed 99% identity with the gene of *Fusarium* sp. WF152 (GenBank Acc No. HQ130708.1) previously reported.

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	III
DEDICATORIAS.....	IV
RESUMEN IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE <i>FUSARIUM</i> EN PLANTAS DE NOCHEBUENA	V
ABSTRACT	VI
CAPÍTULO 1. GENERALIDADES	1
1.1. INTRODUCCIÓN	1
1.3 JUSTIFICACIÓN	2
1.4 OBJETIVOS	2
1.4.1 OBJETIVO GENERAL	2
1.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	2
1.5 HIPOTESIS.....	2
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES	3
2.1 ORIGEN	3
2.2 IMPORTANCIA ECONÓMICA DE LA NOCHEBUENA	3
2.3 PRINCIPALES ENFERMEDADES EN LA NOCHEBUENA COMERCIAL	5
2.3.1 HONGOS.....	6
3.1.1 SPHACELOMA POINSETTIAE	6
2.3.1.2 MANCHA GRIS (BOTRYTIS CINEREA)	6
2.3.1.3 CENICILLA (OIDIUM SP.)	7
2.3.1.4 MANCHA DE LA HOJA (ALTERNARIA EUPHORBIICOLA)	8
2.3.1.5 MOHO DE LA HOJA (CLADOSPORIUM FULVUM).....	10
2.3.1.7 FUSARIUM SPP.....	12
2.3.1.7.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA	13
2.4 SINTOMATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD CAUSADA POR <i>FUSARIUM</i> SP.	14
2.5.1 MACROCONIDIOS.....	14
2.5.2 MICROCONIDIOS	15
2.5.3 CLAMIDOSPORAS	17
2.5.4 OTRAS CARACTERÍSTICAS.....	17
2.5.5 CARACTERÍSTICAS SECUNDARIAS	18
2.6 <i>FUSARIUM OXYSPORUM</i>	19
2.6.1 MACROCONIDIOS.....	20
2.6.2 MICROCONIDIOS	20
2.6.3 CLAMIDOSPORAS	21
2.7 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	21
2.8 ELECTROFORESIS	22
2.10 GEN BANK.....	23
CAPITULO 3. METODOLOGIA	24
3.1. UBICACIÓN DE VIVEROS, MUESTREO Y COLECTA DE PLANTAS.....	24
3.2 IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE <i>FUSARIUM</i> SPP.	25
3.3 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE <i>FUSARIUM</i> SPP.	25
3.3.1 EXTRACCIÓN DE ADN.....	26
3.3.2 AMPLIFICACIÓN MEDIANTE PCR	27

3.3.3 SECUENCIACIÓN DE ADN	28
CAPITULO 4.....	29
RESULTADOS	29
CONCLUSIONES.....	34
BIBLIOGRAFÍA.....	35
ANEXO I.....	40

LISTA DE TABLAS

TABLA1. Producción anual de plantas de nochebuena por estado de 2010 y 2011.4

TABLA 2. Datos de producción de nochebuena en el estado de Morelos en 2010. 5

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Masa de conidios y conidióforos de <i>Oidium</i> sp en hojas de nochebuena.....	7
Figura 2 Conidios de <i>Oidium</i> sp encontrados en hojas de nochebuena.....	8
Figura 3 Síntoma de <i>Alternaria euphorbiicola</i> en una hoja de nochebuena.....	9
Figura 4 Fotografía de conidios de <i>Alternaria euphorbiicola</i> en nochebuena.....	10
Figura 5 Síntomas de <i>Cladosporium fulvum</i> en nochebuena.....	10
Figura 6 Conidios de <i>Cladosporium fulvum</i> encontrados en nochebuena.....	11
Figura 7 Lesiones de color pajizo en el tallo de nochebuena, a causa de <i>Rhizoctonia solani</i>	11
Figura 8 Estructura de <i>Rhizoctonia solani</i> de una planta de nochebuena.	12
Figura 9 Zacatepec, Morelos. Sitio de estudio.....	24
Figura 10 Planta con sintomatología característica de <i>Fusarium</i> spp pérdida de turgencia en las hojas, marchitamiento, pudrición de tallo y raíz.....	29
Figura 11 Pudrición o necrosis de raíz causada por <i>Fusarium</i> spp observada en planta de nochebuena.....	30
Figura 12 Desarrollo de <i>Fusarium</i> spp cultivo monosporico característico por producir un pigmento violeta pálido a oscuro con micelio abundante en PDA utilizado.....	30
Figura 13 Microconidio y macroconidio de <i>Fusarium</i> spp identificadas en cultivos monosporicos realizados a plantas de nochebuena.....	31
Figura 14 Clamidosporas y filiales de <i>Fusarium</i> spp observadas en muestras de nochebuena...	31
Figura 15 Gel de agarosa que muestra la integridad del DNA de <i>Fusarium</i> spp en plantas de nochebuena por electroforesis.....	32
Figura 16 Productos de amplificación por PCR de <i>Fusarium oxysporum</i> en plantas de nochebuena. MM (marcador de peso molecular) Zip Ruler™ (Fermentas, Cat.SM1373); banda 1 muestra Tetela del monte; banda 2 muestra Jiutepec; banda 3 Cuautla.....	32
Figura 17 Identificación molecular de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Melonis</i> en nochebuena.	33

CAPÍTULO 1. GENERALIDADES

1.1. INTRODUCCIÓN

La nochebuena (*Euphorbia pulcherrima*) perteneciente a la Familia Euphorbiaceae, posee brácteas teñidas de color blanco, rosa, amarillo y mezclas de mármol y los tonos rojos tradicionales según la variedad (Daughtrey. *et al.*, 2001). Es de origen mexicano y se cultivó desde la época de los aztecas, quienes la llamaron “Cuetlaxochitl”. Se convirtió en un símbolo de la navidad a partir del siglo XVIII en las fiestas del santo pesebre en Taxco, Guerrero. Es una planta de ornato utilizada en interiores en la época navideña conocida también como flor de pascua o de floración invernal (García, 2008).

La producción nacional de nochebuena es una actividad agrícola importante desde el punto de vista económico y social, a nivel mundial México se ubica en la cuarta posición, con una superficie cultivada de 320 hectáreas y genera aproximadamente 3,200 empleos directos y alrededor de 9,600 indirectos; en Morelos existen 150 productores dedicados a esta actividad (SAGARPA, 2011). En 2012 se cultivaron millones de plantas; de dicha producción nacional 35% se obtuvo en Morelos, colocándolo como el estado de mayor producción de nochebuena en el país, con una producción de casi 5.1 millones de plantas anuales en promedio (SIACON, 2012).

Es un cultivo susceptible a diversas enfermedades causadas por hongos fitopatógenos, uno de los problemas fitosanitarios más importantes en el cultivo de nochebuena es la marchitez de la planta causada por la pudrición en raíz (García *et al.*, 2009), ésta es causada por hongos fitopatógenos, entre los más agresivos se encuentra el género *Fusarium* spp, infectando a las plantas a través de sus raíces, en las que penetran directamente o a través de heridas (Agrios., 2008), causando problemas económicos serios. Por esta razón se pretende identificar mediante pruebas morfológicas y moleculares las especies del género *Fusarium* spp relacionadas con este problema fitosanitario que afecta la productividad de nochebuena en Morelos.

1.3 JUSTIFICACIÓN

Un porcentaje superior al 20 % de la nochebuena se pierde por el desarrollo de pudriciones causadas por *Fusarium* spp y en el estado de Morelos no se sabe cuáles son las especies responsables de estos daños por lo que en la presente investigación se tendrá la información precisa de las especies que causan estos daños.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar morfológica y molecularmente especies de *Fusarium* spp que afecten la producción de cultivos de nochebuena en Morelos.

1.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar morfológicamente la/s cepas obtenidas de *Fusarium* spp.
- Determinar por métodos moleculares la/s especies de *Fusarium* spp presentes en los cultivos de nochebuena.

1.5 HIPOTESIS

Fusarium spp es uno de los principales patógenos responsable de la marchitez y podredumbre radical en plantas de nochebuena ocasionando grandes daños en estos cultivos.

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

2.1 ORIGEN

La planta de nochebuena pertenece a la Familia Euphorbiaceae y al género *Euphorbia* (Shanks, 1980), es originaria de América Central y de México, específicamente de las regiones montañosas y zonas subtropicales (Conzatti, 1988; Grounds, 1965; Vidalie, 1992). En México, la nochebuena se encuentra en forma silvestre en la vertiente Oeste de la Sierra Madre Occidental en los estados de Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, Oaxaca y Chiapas (Martínez, 1995; Mayfield, 1997).

Se caracteriza por su forma de arbusto, presenta grandes hojas alternas o verticiladas de forma dentada, las cuales son de color verde oscuro (Rodríguez, 1985). Las brácteas son de color rojo, amarillo y de otros colores dependiendo de la variedad (Grounds, 1965). El tallo es leñoso con ramas vigorosas y cilíndricas. El ciato es la inflorescencia y está compuesto por flores masculinas, una femenina y una glándula (Rodríguez, 1985). El fruto es una cápsula trilocular. La semilla consta de un endospermo grasoso y carnosos (Larson, 1996). Las raíces son adventicias en plantas comerciales reproducidas a partir de esquejes (Rodríguez, 1985).

2.2 IMPORTANCIA ECONÓMICA DE LA NOCHEBUENA

Joel Robert Poinsett, primer embajador de Estados Unidos de América (E.U.A.) en México, propagó la nochebuena y la introdujo a Carolina del Sur, de donde se dispersó a diferentes lugares, incluyendo jardines botánicos (Ecke *et al.*, 1990; Grounds, 1965; Shanks, 1980). A principios del siglo XX, la empresa Ecke empezó la producción y mejoramiento genético de la nochebuena a partir de las plantas propagadas en Carolina del Sur, vendió la nochebuena como flor de corte en California, E.U.A., y en 1923 la producción de la planta se obtuvo a partir de plántulas previamente seleccionadas con características más atractivas para el consumidor, las cuales eran de menor tamaño y con mayor ramificación (Ecke *et al.*, 1990).

A nivel mundial, la nochebuena en maceta presenta una alta demanda en la época decembrina (Camacho *et al.*, 1989). La planta se ha propagado ampliamente y con rapidez en los E.U.A., Dinamarca, Finlandia, Islandia, Noruega, Suecia, Gran Bretaña, Alemania, Francia, Costa Rica, Holanda y México (Vidalie, 1992).

La demanda de nochebuenas y las fuentes de empleo que genera, la convierten en una de las especies ornamentales de gran importancia económica, a nivel nacional, los principales estados productores de nochebuena en maceta son Morelos, Puebla, Michoacán, el Distrito Federal, Jalisco y Oaxaca, con una producción nacional en promedio de 14.5 millones de plantas, tal como se muestra en la Tabla 1, siendo el estado de Morelos el mayor productor con 5.1 millones de plantas anuales promedio, representando el 35% de dicha producción nacional, colocándolo como el estado de mayor producción de nochebuena en el país, (SIACON, 2012).

TABLA1. Producción anual de plantas de nochebuena por estado de 2010 y 2011.

Estado	2010	2011	Promedio
Distrito Federal	2,839,033	2,726,400	2,990,389
Jalisco	1,235,100	1,571,450	1,403,275
México	177,600	114,000	340,942
Michoacán	3,600,000	4,025,000	2,820,833
Morelos	5,988,690	5,793,900	5,132,048
Oaxaca	23,550	23,751	23,651
Puebla	2,237,991	2,028,910	1,780,332
Total	16,101,964	16,283,411	14,491,470

Fuente: SIACON, 2012.

En el estado de Morelos esta planta se cultiva en los municipios de Cuernavaca, Yautepec, Tepoztlán, Cuautla, Puente de Ixtla, Jiutepec y Emiliano Zapata. La Tabla 2, muestra los datos de producción de cada uno de ellos.

TABLA 2. Datos de producción de nochebuena en el estado de Morelos en 2010.

Ubicación	Superficie Cosechada (ha⁻¹)	Producción (plantas)	Rendimiento (plantas/ha⁻¹)	Precio \$/unidad	Valor Producción (millones de pesos)
CUAUTLA	11	662,200	60,200	25	16,50
CUERNAVACA	35	2,121,000	60,600	25	53,02
EMILIANO ZAPATA	5	310,500	62,100	25	7,76
JIUTEPEC	6	359,840	59,973	25	8,99
PUENTE DE IXTLA	6	377,400	62,900	25	9,43
TEPOZTLÁN	15	918,750	61,250	25	22,96
YAUTEPEC	20	1,239,000	61,950	25	30,97
TOTALES	98	5,988,690	428,973	-	149,63

Fuente: Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP).

La producción de planta terminada se vende directamente en los viveros o en las comercializadoras en la entidad, su mayor comercialización se da entre los meses de noviembre a diciembre, tiempo en el que florece.

El 90% de la producción y consumo de la nochebuena corresponde a variedades con brácteas de color rojo, el 5% son de color blanco o amarillo y el resto son de color rosa, moradas o marmoleadas; todas en diferentes presentaciones (SAGARPA, 2011).

2.3 PRINCIPALES ENFERMEDADES EN LA NOCHEBUENA COMERCIAL

Al igual que otras plantas ornamentales cultivadas bajo condiciones de invernadero, la nochebuena comercial no se encuentra libre de patógenos durante su desarrollo vegetativo, el cual inicia desde la propagación de la planta hasta su comercialización (Ecke *et al.*, 1990).

2.3.1 HONGOS

La producción ornamental se ve afectado por enfermedades del sistema radical, limitando la producción de plantas. Entre los agentes causales, se encuentran las bacterias, nematodos, insectos u hongos fitopatógenos. Dentro de estos últimos, diversas especies de *Fusarium* spp, *Botrytis cinerea*, *Alternaria euphorbiicola*, *Oidium* sp, *Rhizoctonia solani* y *Sphaceloma poinsettiae*, *Cladosporium fulvum*, afectan los cultivos de nochebuena en México, (García *et al.*, 2009; Daughtrey, 2001; Ruehle, 1941).

3.1.1 SPHACELOMA POINSETTIAE

En el cultivo de la nochebuena se encuentran reportes del patógeno en países como E.U.A., Brasil, Jamaica y Puerto Rico (Rubin, 1961; Wehlburg, 1968). El hongo, causante de la enfermedad conocida como roña de la nochebuena, induce lesiones en hojas y tallos (Engelhard, 1983; Rubin, 1961). En hojas, estas lesiones son de color marrón, circulares y con halo clorótico; son cóncavas en el haz y sobresalen en el envés (Alwadie y Baka, 2003). En tallos origina canchales de forma alargada o circular de 1-10 mm, rodeados por bordes de color rojo o púrpura (Jenkins, 1942; Wehlburg, 1968). Las lesiones pueden unirse y cubrir una gran porción del tallo hasta causar la muerte de la planta (Daughtrey *et al.*, 2001; Ruehle, 1941).

2.3.1.2 MANCHA GRIS (BOTRYTIS CINEREA)

Botrytis cinerea es un patógeno ampliamente distribuido que causa enfermedades graves en muchos cultivos de plantas ornamentales. Es el más importante patógeno en la producción de plantas de nochebuena durante su propagación, etapa de crecimiento y el período de floración. En condiciones de humedad, la infección del hongo comienza principalmente en los bordes de las hojas y se extienden hasta cubrir la mayor parte del follaje y tallos. Los tejidos dañados se necrosan rápidamente y se tornan de color oscuro. La resistencia a esta enfermedad se debe a la inhibición del crecimiento de hifas después de la penetración y el espesor de cutícula, entre otros factores.

El moho gris requiere humedad relativa superior a 70% y plantas bajo tensión ambiental, especialmente si estas tienen daños mecánicos como los ocasionados

por las podas. Este hongo puede aparecer en cualquier parte de la planta que se encuentra por encima del suelo y se caracteriza por producir conidios y conidióforos en grandes cantidades, sobre el tejido necrosado, lo cual le da una apariencia aterciopelada de color gris pardo. Los conidióforos son largos y ramificados, cuyas células apicales redondeadas producen racimos de conidios ovoides, unicelulares. Los conidióforos y los racimos de conidios se asemejan a un racimo de uvas (Agrios, 2008).

Después de los períodos de alta humedad, al agitar el tejido infectado, salen nubes de conidios que se desprenden de los conidióforos. Las lesiones en el tallo pueden anillar y causar marchitamiento de la planta por encima de la lesión.

2.3.1.3 CENICILLA (OIDIUM SP.)

Este hongo es un parásito obligado y por lo tanto requiere de una planta huésped viva para completar su ciclo de vida.

Normalmente, no mata a su huésped pero causan deterioro comercial por el aspecto que aparece como pequeñas manchas blancas en el haz de las hojas y brácteas, especialmente cuando la temperatura media es menor a 21°C y la humedad relativa durante las noches es superior a 60% (Figura 1).



Figura 1 Masa de conidios y conidióforos de *Oidium* sp en hojas de nochebuena.

Puede aparecer en cualquier etapa de desarrollo pero especialmente al inicio de la floración y la pigmentación. Cada hongo forma una red de hifas sobre la superficie de la planta, desde la cual penetra en las células epidérmicas y obtiene los nutrientes que necesita para su desarrollo, mediante sus haustorios. Los conidios de *Oidium* sp forman cadenas y son elipsoides o tienen forma de barril (Figura 2).



Figura 2 Conidios de *Oidium* sp encontrados en hojas de nochebuena.

2.3.1.4 MANCHA DE LA HOJA (ALTERNARIA EUPHORBIICOLA)

Los síntomas causados por *Alternaria euphorbiicola* son lesiones angulares, circulares o irregulares, rodeadas de un halo clorótico de 1 a 20 mm de diámetro, las hojas infectadas pueden volverse cloróticas y caer prematuramente (Figura 3).



Figura 3 Síntoma de *Alternaria euphorbiicola* en una hoja de nochebuena.

En el tallo las lesiones son alargadas y hundidas de color marrón con bordes negros, pueden circundar el tallo. *Alternaria euphorbiicola* tiene conidios lisos, marrones y pálidos con células apicales muchas veces alargadas (pseudorostros) que son claramente separables del resto de la espora. Los conidios son ovoides o elipsoides, y están solos o en cadenas de cuatro a cinco o más. Cada pseudorostros funciona como un conidióforo. Los conidios tienen septos transversales bien definidos; los septos longitudinales son menos claros. Los aislados de conidios de nochebuena miden 10-20 μm con un pseudorostros de 8-12 μm y tres a ocho septos transversales, y uno a cuatro septos longitudinales en las células más grandes (Figura 4).

Esta enfermedad no es un grave problema en los invernaderos donde el follaje se puede mantener a baja humedad relativa mediante una regulación ambiental y el retiro de las hojas y plantas enfermas.

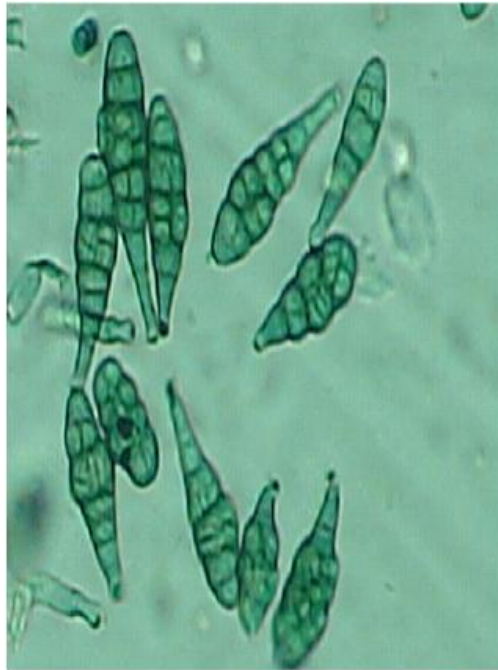


Figura 4 Fotografía de conidios de *Alternaria euphorbiicola* en nochebuena.

2.3.1.5 MOHO DE LA HOJA (CLADOSPORIUM FULVUM)

Es una enfermedad que crece en condiciones de alta humedad relativa con temperaturas altas en el día y noches frescas. Generalmente, las hojas son las afectadas por esta enfermedad, cuyos síntomas inician como manchas de coloración verde pálido y finalizan de un color grisáceo, se observan en primer lugar en la superficie del haz de la hoja, las manchas y necrosan el tejido (Figura 5).



Figura 5 Síntomas de *Cladosporium fulvum* en nochebuena

Ocasionalmente, el hongo ataca hojas, pedúnculos, tallos y botones florales. Los conidióforos salen del interior de la hoja a través de los estomas, los cuales son normalmente ramificados y presentan cierta constricción en la base y más anchos en el ápice; los conidios son de forma ovoide a cilíndrica e irregular, algunos con forma de limón; a menudo en forma simple o ramificada (Figura 6) (Barnett y Hunter, 1972).



Figura 6 Conidios de *Cladosporium fulvum* encontrados en nochebuena.

2.3.1.6 PUDRICIÓN POR RHIZOCTONIA (*RHIZOCTONIA SOLANI*)



Figura 7 Lesiones de color pajizo en el tallo de nochebuena, a causa de *Rhizoctonia solani*.

El patógeno *R. solani* produce un micelio estéril que es incoloro cuando pasa por su etapa juvenil pero que se torna amarillo o de color café claro conforme madura. El micelio consta de células largas y produce ramificaciones que crecen casi en ángulo recto con respecto a la hifa principal, se estrechan ligeramente a nivel de la bifurcación y posee un septo cerca de ella (Figura 8) (Agrios, 2008).



Figura 8 Estructura de *Rhizoctonia solani* de una planta de nochebuena.

Las condiciones que favorecen el desarrollo de la enfermedad son: baja radiación solar, alta humedad y altas temperaturas (Molina, 2006).

2.3.1.7 FUSARIUM SPP.

El hongo se encuentra en E.U.A.; ataca la corona, tallo y raíz (Caesar, 1996). Ocasiona enfermedades graves y de amplia distribución, inverna en el suelo o en restos de plantas, en forma de esporas asexuales de pared gruesa denominadas clamidosporas, o bien en forma de micelio o esporas en restos vegetales. Son organismos saprofitos y una vez que se introducen en un terreno de cultivo, se establecen ahí por tiempo indefinido, aunque su número poblacional varía en forma considerable, dependiendo de la susceptibilidad y tiempo de cultivo de la planta hospedante en el campo.

La mayoría de los hongos de este género que producen marchitamientos vasculares pertenecen a la especie *Fusarium oxysporum*, mientras que otras

como *Fusarium solani* y sus formas especiales, ocasionan marchitez vascular, pudrición de semillas, raíces así como también en plántulas (ahogamiento), tallos inferiores, coronas, cormos, bulbos, tubérculos y otras partes de la planta. (Agrios, 2008).

La infección empieza cuando las clamidosporas presentes en el suelo son diseminadas por el viento, insectos o por salpicaduras de agua de riego (Caesar *et al.*, 1998; Daughtrey *et al.*, 2001; Kremer *et al.*, 2006).

2.3.1.7.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

El género *Fusarium* sp., fue descrito por Link en 1809. Desde entonces la taxonomía ha sido muy complicada debido a que las descripciones iniciales se hicieron en base a las características que varían, según los medios que se utilizaban. Se considera que este género exhibe un grado de variación con respecto a la morfología microscópica y a sus características fisiológicas, debido a su gran habilidad para colonizar diversos hábitats ecológicos (Nelson *et al.*, 1994). Según Barnett y Hunter (1978) la clasificación *Fusarium* spp se encuentra en:

Reino: Fungi

División: Eumycota

Clase: Deuteromycetes

Orden: Moniliales

Familia: Moniliaceae

Género: *Fusarium*

Especie: *F. oxysporum*, *F. moniliforme*, entre otros.

La correcta identificación de las especies de *Fusarium* spp requiere de una observación detallada del cultivo, ya que el género se caracteriza por una gran variabilidad morfológica bajo diferentes condiciones de cultivo. Las características que permiten la identificación del género *Fusarium* spp se determinan

macroscópicamente y microscópicamente. Estas son agrupadas en características primarias y secundarias, utilizadas para separar las especies. Las características primarias incluyen: la forma de los macroconidios, origen y forma de los microconidios, tipo de conidióforo, y la presencia o ausencia de clamidosporas, mientras que en las secundarias se encuentran: la presencia o ausencia de esporodoquios, morfología y pigmentación de la colonia (Nelson *et al.*, 1994; Figueroa-Rivera *et al.*, 2010).

2.4 SINTOMATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD CAUSADA POR *FUSARIUM SP.*

Los síntomas pueden aparecer en cualquier etapa de desarrollo, desde que se colocan en la maceta definitiva, hasta la etapa de pigmentación; durante este periodo se puede ver que el follaje de las plantas se marchita, las ramas se colapsan, las hojas caen y la planta muere.

Las hojas o partes de las plantas infectadas pierden turgencia, se debilitan, adquieren una tonalidad que va del verde claro al amarillo verdoso. Las hojas marchitas pueden estar extendidas o bien enrollarse. Los retoños tiernos y jóvenes también se marchitan y mueren (Molina, 2006).

Produce marchitez vascular, infectando a las plantas a través de sus raíces, en las que penetran directamente o a través de heridas, la pudrición de la raíz y del tallo en un principio se presenta en forma de áreas blandas que más tarde adquieren un color que va de café a negro, en algunos casos se cubre de micelio blanco. Las raíces, tallos y otros órganos son destruidos rápidamente, hasta que toda la planta muere o muestra un desarrollo insuficiente (Agrios, 2008).

2.5 MORFOLOGÍA DE *FUSARIUM SP.*

2.5.1 MACROCONIDIOS

Los macroconidios son la característica morfológica más importante en la identificación de especies de *Fusarium*.

En muchos casos la morfología de esta spora es suficiente para identificar a las especies de un cultivo.

El primer carácter macroconidial es el tamaño, la longitud en términos de largo o corto, sin tener en cuenta a la anchura o curvatura. Toda la longitud de la espora incluyendo las células apicales y el pie, y no sólo el principal cuerpo de la espora.

Hay tres formas básicas: En primer lugar, no son macroconidios rectos, que pueden aparecer en forma de aguja si son delgada. La siguiente son macroconidios con curvatura dorsiventral a lo largo de toda o una porción de la espora. Estas esporas por lo general, pero no siempre, son aproximadamente de la misma anchura a lo largo de toda su longitud. Por último, hay macroconidios en el que el lado dorsal (superior) es claramente más curva que la parte ventral (inferior). En estas esporas, las células en el medio de la espora por lo general son más anchas que las células en los extremos.

Los extremos de los macroconidios a menudo son importantes en determinaciones morfológicas. La forma tanto apical y del pie de la célula pueden ser también importantes delimitadores de especies.

Hay cuatro formas generales de las células apicales contundentes: desafilado, papillate, ganchudo y estrecha.

Los caracteres de diagnóstico más importantes son el grado de curvatura, longitud relativa, y de forma general.

La célula basal, o el pie, también tiene cuatro formas generales: en forma de pie, la forma de pie alargado, con marcas y sin marcas.

La célula basal por lo general es la menos curvada de la espora. Las características más importantes son la longitud relativa de la célula y su forma (Leslie y Summerell, 2006).

2.5.2 MICROCONIDIOS

Microconidios no son producidos por todas las especies de *Fusarium* spp por lo que su sola presencia es una característica importante. Los caracteres potencialmente importantes para el diagnóstico son: las conidiógenas celda en la

que soportados, y la disposición de la microconidias en y alrededor de la celda conidiógena.

La primera característica de los microconidios es el tamaño. Al igual que con la macroconidios, el objetivo es determinar el promedio general y no inspeccionar de cerca y caracterizar las esporas en los bordes de la gama. El número de septos deben ser contados.

El número de septos para los microconidios son normalmente de 0 o 1, pero algunas especies pueden producir conidios con dos septos.

Las formas más comunes de los microconidios son: ovalada, reniforme (forma de riñón), ovoide con una base truncada, piriforme (forma de pera), napiforme (forma de gnabo-cormo), globosa y fusiforme (forma de huso). Un solo cultivo puede producir microconidios con más de una forma. En algunos casos, la frecuencia relativa de las esporas con diferentes formas puede variar.

Las células conidiógenas son de dos tipos básicos: monofialides y polifialides. La diferencia se debe al número de aberturas por célula a través del cual se producen los conidios. Los monofialides sólo tienen una sola abertura por célula, mientras polifialides tiene más de una. Muchas de las especies que producen polifialides, por ejemplo, *F. proliferatum*, pueden producir más monofialides de lo que hacen las polifialides.

Los microconidios pueden disponer sobre los fiálides solos, en cadenas, o en falsas cabezas. La longitud de las cadenas puede variar desde unas pocas esporas a un rodillo muy largo. La formación de la cadena puede depender del medio utilizado. Por ejemplo, se formarán algunas especies en agar agar cloruro de potasio (KCl), pero no en agar clavel (CLA). La longitud de los microconidios en forma de cadena puede ser un importante carácter de la especie y la longitud de estos en el micelio aéreo debe tenerse en cuenta. Las especies de *Fusarium* spp no producen verdaderos conidios como las que se encuentran en algunos otros hongos, por ejemplo, *Aspergillus*, pero puede producir grumos de esporas en el extremo de las fiálides que superficialmente parecen cabezas de esporas. Las

falsas cabezas podrían resultar de la caída de cadenas de esporas de las nuevas fiálides o pueden ser la única forma en que los microconidios están presentes.

2.5.3 CLAMIDOSPORAS

Las clamidosporas son una característica importante en muchas descripciones de las especies de *Fusarium* spp. No están bien conservadas evolutivamente, sin embargo, las especies que producen clamidosporas pueden estar estrechamente relacionadas con aquellas que no lo hacen. Las clamidosporas se pueden formar por separado, en grupos y en cadenas. Estas pueden tardar mucho tiempo (más de 6 semanas) para reproducirse, y puede no ser producido en grandes cantidades. Las clamidosporas a menudo se forman más fácilmente en agar especial agar especial (SNA) que en CLA, pero en algunos casos en un medio aún más especializados (agar suelo) puede ser requerido para su observación. Las clamidosporas puede que se encuentre en el micelio aéreo o incrustado en el agar, y la ubicación a menudo es importante en la identificación de especies.

2.5.4 OTRAS CARACTERÍSTICAS

Además de macroconidios, microconidias, y clamidosporas, y las estructuras relacionadas, algunas otras características también se han utilizado para la delimitación de especies. Algunas especies producen cristales en los medios, pero mientras esta característica a menudo es indicativa por lo general no es diagnóstico. Del mismo modo, la capacidad de producir estructuras de tipo esclerocios es considerado como una característica de diagnóstico importante por algunos investigadores. Son de importancia primordial como un indicador de cepas que es probable que sean relativamente cepas altamente femenino-fértiles, y que la producción de tales estructuras puede variar ampliamente dentro de una.

Mesoconidia es un término propuesto por Pascoe (1990), para describir los conidios que típicamente se producen en algunas especies de *Fusarium polyphialides*. Estas esporas no se producen en esporodoquios. Se utiliza este término porque estos conidios no se consideraron ni macro ni microconidios.

Ellos son significativamente más grandes que los microconidios y normalmente tienen una forma fusoides con hasta 3-4 septos.

Los mesoconidios generalmente se adhieren en el micelio aéreo y con frecuencia tienen un "orejas de conejo" cuando se observan a través del microscopio. Especies que incluyen productos de mesoconidios *F. camptoceras*, *F. chlamydosporum*, *F. semitectum*, *F. sporotrichioides*, *F. polyphialidicum* y algunas cepas de *F. avenaceum* y *F. subglutinans*.

La etapa teleomorfa puede ser una característica definitiva de unas especies. Normalmente, estas etapas sexuales se observan en condiciones controladas de laboratorio en lugar del campo. En tales casos, la producción conjunta de la etapa sexual por una cepa conocida, probador de laboratorio y la cepa de campo se cruza con él y se interpreta en el sentido de que la cepa de campo pertenece a la misma especie biológica como la cepa de ensayo del laboratorio. La morfología de un teleomorfo por lo general no es suficientemente diferente como para ser utilizado como marcador morfológico para fines de identificación, pero la formación de la etapa teleomorfa puede ser muy importante (Pascoe 1990, Leslie y Summerell, 2006).

2.5.5 CARACTERÍSTICAS SECUNDARIAS

Un número de caracteres secundarios también se utilizan en la identificación de especies de *Fusarium* spp. La más prominente de estas características secundarias son la pigmentación del cultivo y los medios de cultivo, algunos de los cuales son sensibles a la luz y otros son sensibles al pH del agar en el que han sido colocados. El Agar Papa Dextrosa (PDA) es el medio de elección y se prefiere el ciclo de 12:12 horas luz: oscuridad, a menos que se especifique lo contrario en las descripciones de la especie. Para hacer comparaciones de colores, una guía de color estándar tal como el de Kornerup y Wanscher (1978), se requiere diferenciar tonos de colores particulares. Los colores pueden ser observados ya sea en placas, y por lo general se puede evaluar con fiabilidad después de aproximadamente una semana de incubación. Los pigmentos no son

un diagnóstico para unas especies, con el pigmento amarillo producido por cultivos de *F. thapsinum*.

La tasa de crecimiento es otra característica secundaria comúnmente utilizada. No puede haber alguna variación en este rasgo. Tradicionalmente, las mediciones se realizan en Placas de PDA inoculado con esporas individuales y se cultivaron durante tres días a una temperatura entre 25 ° a 30 ° C. Se mide el diámetro de las colonias, y es importante hacer varias réplicas de placas para asegurar que se ha hecho una medición precisa.

Metabolitos secundarios y micotoxinas también pueden ser utilizados como caracteres de identificación secundarias, aunque el potencial de la capacidad de una cepa para formar una micotoxina a menudo es un razón para tratar de identificarlo. Algunas cepas producen compuestos volátiles que dan como resultado un olor que es de diagnóstico si presentar. En otros casos perfiles químicos complejos de todos los metabolitos secundarios presentes se puede utilizar para agrupar cepas con estos grupos a continuación, asociados con especies especiales (Nelson *et al.*, 1983; Thrane, 2001; Leslie y Summerell, 2006).

2.6 FUSARIUM OXYSPORUM

Un patógeno de la marchitez vascular importante en muchas especies de plantas en todo el mundo. Un saprofito común del suelo. Caldo agar lactosado es el medio para examinar sus principales características. Los Macroconidios se forman en claro naranja, por lo general en abundantes esporodoquios. Los macroconidios es corto y medio de longitud, encorvada a casi recto, de paredes delgadas y por lo general con 3 septos. La célula apical es corta y está ligeramente enganchado en algunos aislamientos. La célula basal es dentada o en forma de pie. Los macroconidios se forman de monophialides sobre conidióforos ramificados en esporodoquios y en menor medida de monophialides sobre hifas.

Los Microconidios generalmente son 0 septados, puede ser oval, elípticas o reniformes (en forma de riñón), y se forman en abundancia en las falsas cabezas en monophialides cortos. Clamidosporas se forman abundantemente en hifas en la

superficie del agar en la mayoría de los aislados, especialmente clones saprofitas del suelo, pero puede ser lentos (4-6 semanas) de formar en algunos aislamientos. Características en PDA. Morfología de la colonia en PDA varía ampliamente. El micelio puede ser floccose, escaso o abundante y varían en color desde el blanco hasta el violeta pálido, abundante pálido naranja o violeta pálido los macroconidios se producen en un centro de masa de esporas en algunos aislamientos. Un pequeño marrón pálido, azul de esclerocios de color negro azulado o violeta se pueden producir en abundancia por algunos aislados.

F. oxysporum por lo general produce un pigmento violeta pálido a oscuro o magenta oscuro en el agar pero algunos aislamientos no producen ningún pigmento en absoluto. Algunos aislados de *F. oxysporum* mutan fácilmente a la pionnotal forma o en un plano "húmedo" colonias de micelio con un color amarillo a apariencia de color naranja cuando se cultivan en la PDA (Leslie y Summerell, 2006).

2.6.1 MACROCONIDIOS

Esporodoquios: La mayoría de los aislados producen abundantes esporodoquios de color naranja pálido, sin embargo, en algunos aislamientos los esporodoquios pueden ser escasos o inexistentes.

Morfología general: Corto y mediana longitud, recta a ligeramente curvadas, relativamente delgada y de paredes delgadas.

Morfología célula apical: Cónico y curvas, a veces con un ligero gancho.

Morfología célula basal: Los pies en forma de punta.

Número de tabiques: Generalmente 3 septos.

Abundancia: Escaso en algunas cepas, pero por lo general abundante en esporodoquios y ocasionalmente de hifas creciendo en la superficie del agar.

2.6.2 MICROCONIDIOS

Forma / tabicación: oval, elíptica o en forma de riñón y por lo general 0 septadas.

Área presentación micelio: cabezas falsas.

Células conidiógenas: monophialides cortos.

Abundancia: Abundante en el micelio aéreo.

2.6.3 CLAMIDOSPORAS

Abundancia / velocidad de la formación: Formado en abundancia y rápidamente (2-4 semanas en CLA) por la mayoría de los aislados, pero algunos aislados forma lentamente clamidosporas si forman ellos en absoluto.

Ubicación: Generalmente formado solos o en parejas, sino también se pueden encontrar en racimos o en cadenas cortas. Puede ser terminal o intercalado en antena, sumergida, o de la superficie hifas.

Apariencia: lisa o rugosa amurallada especie (Leslie y Summerell, 2006).

2.7 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Conocida por las siglas PCR (*Reacción en cadena de la polimerasa*), permite ampliar varios millones de veces una secuencia nucleotídica específica que se desea estudiar o detectar.

El principio relativamente simple de este método se basa en la capacidad de síntesis de una cadena de ADN por una enzima de replicación, la ADN polimerasa, utilizando como cebador de cortas secuencias nucleotídicas alrededor de 20 pares de bases. Los dos cebadores, complementarios de cada una de las dos cadenas del ADN, permiten ampliar el fragmento de ADN comprendido entre las zonas de apareamiento.

Tiene lugar la reacción en cadena, porque esta secuencia no solamente es duplicada a partir de la molécula inicial sino también a partir de las cadenas nuevamente sintetizadas. La recepción de varios ciclos desnaturalización-hibridación-extensión (alrededor de 20 – 40 ciclos) es la que conduce a una acumulación exponencial de ADN.

La sucesión de las tres etapas ha podido ser automatizada en un termociclador gracias a la acción de la enzima resistente a las temperaturas elevadas. Esta enzima es la Taq polimerasa, extraída de la bacteria termófila *thermus aquaticus* que ha sido introducida en 1988 por Saiki et al., los “inventores” de la PCR.

Después de que el ADN ha sido ampliado, es necesario visualizarle y caracterizarle. Su longitud se verifica por electroforesis (Albouy y Devergne, 2000).

2.8 ELECTROFORESIS

La electroforesis se basa en el principio de que una molécula colocada en un campo eléctrico migra al electrodo apropiado a una velocidad (movilidad electroforética) proporcional al campo de fuerza y a su propia carga neta. Por esta razón, una mezcla de moléculas de DNA (o de proteínas), puede separarse electroforéticamente en función de: a) el tamaño, b) la forma o conformación molecular y c) la magnitud de las cargas netas. Cuando se coloca una mezcla de moléculas en la misma posición en un campo eléctrico, los componentes individuales se resuelven en bandas discretas que migran en distintas posiciones.

En soluciones acuosas en condiciones fisiológicas, los grupos fosfato de los ácidos nucleicos se encuentran ionizados con una carga negativa (aniones) por lo que migrarán al electrodo positivo (ánodo), cuando son sometidos a un campo eléctrico. Asimismo, al aumentar la viscosidad del medio o soporte en el que migran las moléculas, las de menor peso molecular se moverán con mayor facilidad que las de tamaños mayores, y así las moléculas son separadas exclusivamente en función de su tamaño.

Los soportes más utilizados en los métodos de separación por electroforesis son la agarosa y la poliacrilamida. La agarosa forma geles o gelatinas al establecer puentes de hidrógeno cuando se encuentra en soluciones acuosas frías; el tamaño del poro, a través del cual deben migrar las moléculas de ácidos nucleicos, depende directamente de la concentración de la agarosa. Los geles de poliacrilamida se generan por el entre- cruzamiento covalente de los polímeros de acrilamida y su monómero bisacrilamida. Con estos polímeros puede obtenerse una amplia gama de tamaños de poro variando las proporciones de acrilamida-

bisacrilamida y el grado de polimerización y de esta manera se controla el tamaño del fragmento de DNA que se mueve por el gel. Por regla general, los geles de agarosa al 1% pueden resolver y separar fragmentos lineales de DNA en el rango de 30 a 0.2 kilonucleótidos (30 000 a 200 nucleótidos), mientras que los geles al 7.5% de poliacrilamida resuelven fragmentos de 2 a 0.05 kilonucleótidos (2 000 a 50 nucleótidos).

Los fragmentos de DNA sometidos a electroforesis se pueden visualizar si se les tiñe, por ejemplo, con sustancias que fluorescen al ser irradiadas con luz ultravioleta, como es el caso del bromuro de etidio. Para ello, los geles de agarosa o acrilamida se sumergen directamente en una solución de este compuesto, el cual se intercala entre las dos hélices del DNA, y así las bandas de DNA se observan de color blanco-naranja al irradiar el gel con luz ultravioleta. Importa destacar que la intensidad de la tinción es directamente proporcional al tamaño de los segmentos de DNA; en consecuencia, las bandas de mayor peso molecular tendrán fluorescencia más intensa que las bandas de menor peso molecular.

Cada fragmento de DNA observado en el gel representa una población homogénea en tamaño de moléculas de DNA, (Bolívar, 2007).

2.10 GEN BANK

GenBank ® Es la base de datos de secuencia genética, una colección comentada de todas las secuencias de ADN disponible en internet (Nucleic Acids Research, Enero 2013). El Gen Bank es parte de la base de datos de secuencias de nucleótidos Colaboración Internacional, que cuenta con el banco de datos de ADN de Japón (DDBJ), el Laboratorio Europeo de Biología Molecular (EMBL) y GenBank en NCBI. Estas tres organizaciones intercambian bases de datos en forma permanente.

CAPITULO 3. METODOLOGIA

3.1. UBICACIÓN DE VIVEROS, MUESTREO Y COLECTA DE PLANTAS

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Fitopatología del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo experimental "Zacatepec", Morelos (18°39'32.4" N, 99°11'42" W).

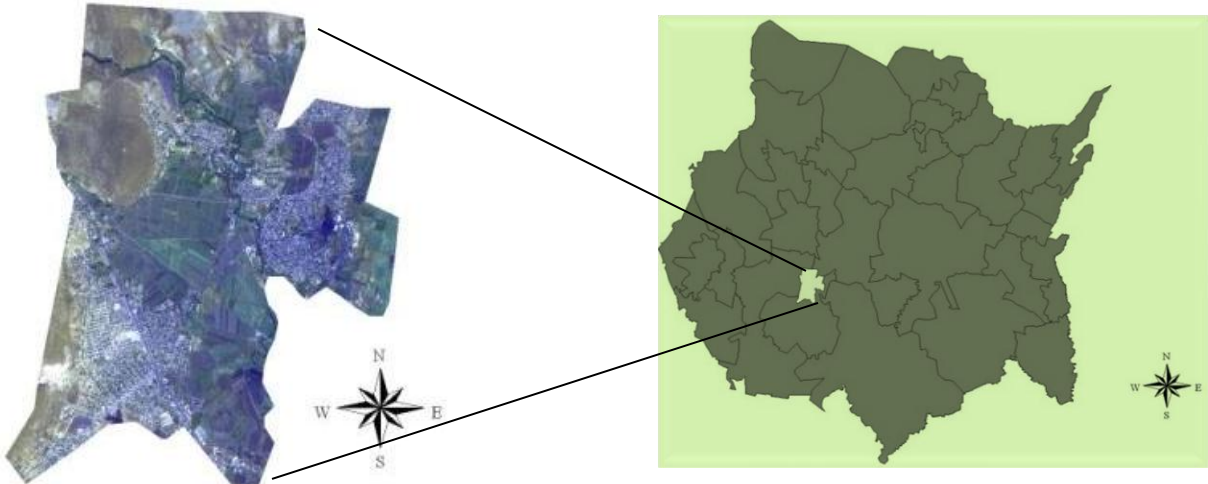


Figura 9 Zacatepec, Morelos. Sitio de estudio.

Inicialmente, se realizó el geoposicionamiento de los viveros productores de nochebuena en tres localidades de Morelos, ubicados en Cuautla (18° 51' 4.55" 98° 58' 46.63"), Jiutepec (18° 51' 33.42" 99° 10' 3.82") y Tétela del Monte (18° 58' 5.38" 99° 16' 8.66"), colocando 5 repeticiones y 20 tratamientos por vivero, sembrados en macetas de 8 pulgadas.

Se identificaron plantas de nochebuena con síntomas de *Fusarium* spp cuyas características incluían pérdida de turgencia en las hojas, marchitamiento y pudrición de tallo. Las plantas que presentaban esta sintomatología se trasladaron al laboratorio de Fitopatología, al mismo tiempo se tomaron 5 muestras de sustrato aleatoriamente (plantas sin síntomas) en cada repetición. Cada sustrato colectado en campo se colocó en frascos de vidrio estériles.

Posteriormente, en el laboratorio se revisaron las raíces de las plantas con síntomas y se tomaron de las plantas infectadas muestras de raíz y tallo, así como de sustrato. En la cámara de flujo laminar, y con un bisturí estéril, se realizaron cortes de tejido dañado y sano, se colocaron en cuatro secciones por placa Petri. El medio de cultivo empleado fue: Agar Papa Dextrosa (PDA); este se acidificó para evitar el crecimiento de bacterias, y se incubaron a 25-28°C por tres días.

Del sustrato colectado en la base y alrededor de cada una de las plantas enfermas y aparentemente sanas, con la ayuda de unas pinzas de disección se tomaron 10 gr del suelo. Para procesar las muestras, fueron mezcladas con 90 ml de agua destilada y se agitaron durante 5 minutos. Posteriormente, se prepararon diluciones de 1:10, 1:100, 1:1000, tomando 1 ml de la solución original en 9 ml de agua destilada (1:10), igualmente se preparó la solución 1:100, a partir de la dilución 1:10. Seguidamente, se realizó una dilución 1:1000 a partir de la solución 1:100. Finalmente, se sembró 0.5 ml de cada una de las diluciones preparadas sobre el medio de cultivo PDA; previamente acidificado para evitar el crecimiento de bacterias, y se incubaron a 25-27°C por tres días (Leslie y Summerell 2006)

3.2 IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE *FUSARIUM* SPP.

Pasado el tiempo de incubación, se aislaron los hongos, separando las cepas obtenidas, para identificarlas al microscopio, empleando el manual Leslie y Summerell (2006). Para esto, se tomó una porción de micelio con una asa micológica, se colocó sobre un portaobjetos con una gota de lactofenol, y se observó al microscopio con los objetivos 4, 10, 40 y 100x.

Las cepas identificadas como *Fusarium* spp se aislaron por la técnica de cultivos monosporicos, para evaluar sus características morfológicas; luego se confirmó su especie por claves taxonómicas de *Fusarium* spp (Leslie y Summerell, 2006).

3.3 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *FUSARIUM* SPP.

Para la identificación molecular se aisló *Fusarium* del cultivo monospórico en medio líquido, donde se utilizó un matraz Erlenmeyer de 125 ml con 25 ml de

medio Papa Dextrosa. *Fusarium* spp se transfirió con un sacabocados de diámetro de 0.5 cm y se situó dentro del matraz. Posteriormente, se colocó en un agitador a 175 rpm con una temperatura de 25 ° C durante cuatro días.

La extracción del micelio se realizó a través de un filtro por el vertido de medios líquidos, que contiene el crecimiento del hongo. Posteriormente, el filtrado del cultivo se dejó escurrir por un momento, y se lavó el micelio dos veces con agua destilada estéril.

Posteriormente, se retiró el micelio lavado con una espátula limpia y se colocó sobre un bloque de toallas estériles.

3.3.1 EXTRACCIÓN DE ADN

Para la extracción de ADN de los aislamientos de *Fusarium* spp se utilizó el kit DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

Se tomaron 3 cepas diferentes que presentaban características morfológicas de *Fusarium* spp. Se pesaron por cepa 100 mg de tejido micelial y se agregó 400 µl de buffer AP1 y 4 µl de ARNasa, y fue macerado usando un mortero y pistilo. Después se agitó en vórtex y se incubó por 10 minutos, en baño maría, a 65°C, invirtiendo el tubo 2 o 3 veces durante ese tiempo. Seguidamente, se agregaron 130 µl de buffer AP2 (Ácido acético); se mezcló e incubó por 5 minutos en hielo; luego, se centrifugó el lisado por 5 minutos, a 14000 rpm. Seguidamente se transfirió a una columna QIAshredder, ubicada dentro de un tubo de 2 ml. Esta se centrifugó 2 minutos a 14000 rpm. El filtrado se transfirió a un nuevo tubo. A este nuevo tubo se le agregó 1.5 volúmenes de buffer AP3/E (Clorhidrato de Guanidina) y se mezcló.

Posteriormente, se tomaron 650 µl de la nueva mezcla, y se transfirieron a una columna DNeasy Mini con tubo colector de 2 ml. Se centrifugó 1 minuto a ≥ 8000 rpm, para luego descartar el filtrado, y se repitió este paso con la muestra restante. Se cambió el tubo colector de 2 ml, y se agregaron 500 µl de buffer AW; se mezcló y se centrifugó por 1 minuto a ≥ 8000 rpm; se descartó el filtrado.

Después, se agregaron 500 µl de buffer AW, y se centrifugó por 2 minutos a 14000 rpm. Se removió la columna con cuidado, para evitar contacto con el filtrado; se transfirió la columna a un nuevo tubo de 2 ml, se le agregaron 50 µl de buffer AE directamente sobre la membrana DNeasy (10 mM Tris·Cl, 0.5 mM EDTA, pH 9.0, precalentado a 65°C), para la elución. Se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente, y se centrifugó por 1 minuto a 14000 rpm. Seguidamente, se repitió la adición del buffer AE. Con esto, el ADN quedó listo para su uso.

Posteriormente, se evaluaron las muestras de ADN mediante electroforesis, usando 5µl de cada muestra de templado de ADN y 1 µl de Buffer de Carga 6X (0.25% azul de bromofenol, 0.25 % azul xilencianol y 30 % glicerol), y se corrió en una electroforesis de gel de agarosa al 1.2%, a 80 V durante 35 minutos (Bolívar, 2007).

3.3.2 AMPLIFICACIÓN MEDIANTE PCR

Para la reacción de PCR se utilizó la enzima **GoTaq® DNA Polimerasa-Mediante PCR Amplificación** (Promega, M829), que se detalla a continuación: se empleó un volumen de reacción de 25 µl, que contiene 1X de buffer de PCR (5X Green o Colorless GoTaq® Flexi Buffer1), 1.5 mM de MgCl₂, GoTaq® DNA Polimerasa 1.2u/µl, 0.2 mM dNTP`s, 0,6 mM de cada oligo ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') y ITS4 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') (White *et al.*, 1990) y de ADN genómico de 10 ng de cada muestra obtenida.

Se utilizó un termociclador marca TECHENE Mod.TC412. El programa de PCR aplicado fue el siguiente: desnaturalización inicial de 5 minuto a 94°C; 35 ciclos, que comprenden desnaturalización a 94°C por 30 segundos, 30 segundos de alineamiento a 61°C, y extensión a 72°C por medio minuto, seguido de una extensión final a 72°C por 5 minutos. Para la evaluación electroforética de las muestras, se usaron 5 µl de cada muestra del PCR, empleando el marcador de peso molecular Zip Ruler™ (Fermentas, Cat.SM1373), y se corrió en un gel de agarosa al 1.2%, 80 V durante 35 min.

Posteriormente, se realizó la cuantificación de ADN utilizando el equipo EPOCH, Biotek, se colocaron 2 µl de cada muestra, la cuantificación se realizó por densidad óptica con lecturas de 260 y 280 nm.

3.3.3 SECUENCIACIÓN DE ADN

Se limpió la muestra con el Kit DNA Clean & concentrator-25TM (Catalogo No. D4033) siguiendo el protocolo del fabricante. La mezcla DNA/Oligo debe ser de un volumen final de 16 µl, en agua grado biología molecular. Se utilizó el equipo Perkin Elmer/Applied Biosystems Modelo 3730 con capacidad para procesar 96 muestras en 4 hs siguiendo el método Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Fluorescence-Based Sequencing, en el Instituto de Biotecnología, UNAM. Las secuencias obtenidas se analizaron con BLAST (*The Basic Local Alignment Search Tool: blast.ncbi.nlm.nih.gov/*) y se alinearon con la base de datos del GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI), USA. De los valores cuantitativos generados, sólo se consideraron los mayores.

CAPITULO 4.

RESULTADOS

El material vegetal colectado mostró la siguiente sintomatología; hojas o partes de las plantas perdieron turgencia, se debilitaron, mostraron una tonalidad que va del verde claro al amarillo verdoso, las hojas marchitas se encontraron extendidas o bien enrolladas, los retoños tiernos y jóvenes también presentan marchitamiento (Figura 10).



Figura 10 Planta con sintomatología característica de *Fusarium* spp pérdida de turgencia en las hojas, marchitamiento, pudrición de tallo y raíz.

Se presentó pudrición de raíz y tallo, en forma de áreas blandas de un color que va de café a negro, en algunos partes con presencia de micelio blanco (Figura 11).



Figura 11 Pudrición o necrosis de raíz causada por *Fusarium* spp observada en planta de nochebuena.

Las cepas identificadas como *Fusarium* spp fueron: muestra de sustrato de la localidad de Jiutepec, en segundo lugar una muestra de tallo de la localidad de Tetela del monte y por último se identificó una muestra de raíz procedente de Cuautla.

Por medio de la técnica de cultivos monosporicos se observó colonias de *Fusarium* spp estas variaban del color violeta a tonalidades rojizas (Figura 12).

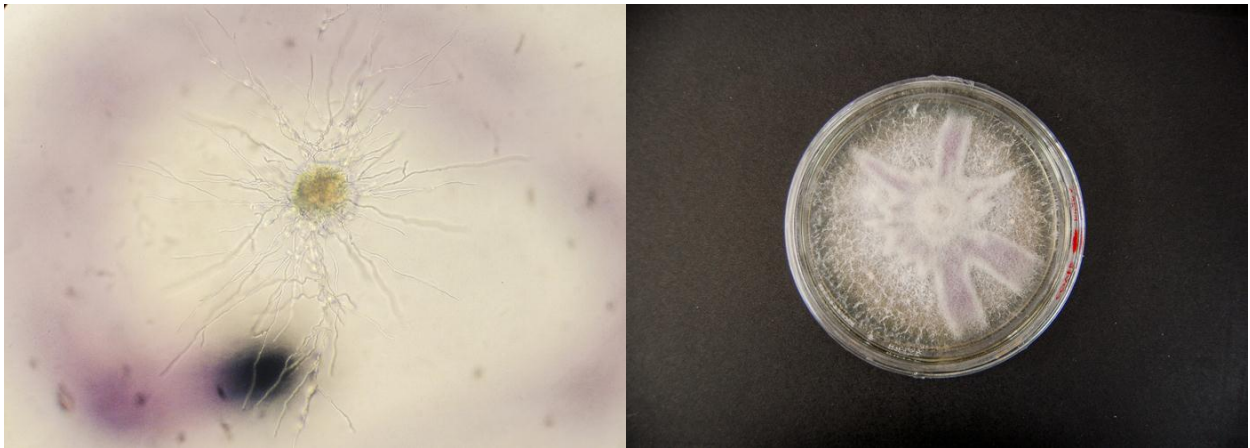


Figura 12 Desarrollo de *Fusarium* spp cultivo monosporico característico por producir un pigmento violeta pálido a oscuro con micelio abundante en PDA utilizado.

En el microscopio se identificaron plenamente las estructuras de *Fusarium* spp a los 10 días se observó la presencia de clamidosporas, fiálides, macroconidios de

tres a cinco septos y conidios unicelulares. De esta forma se determinó que todos los aislamientos coincidían con las descritas para *Fusarium* spp como se ilustra en las Figuras 13 y 14.

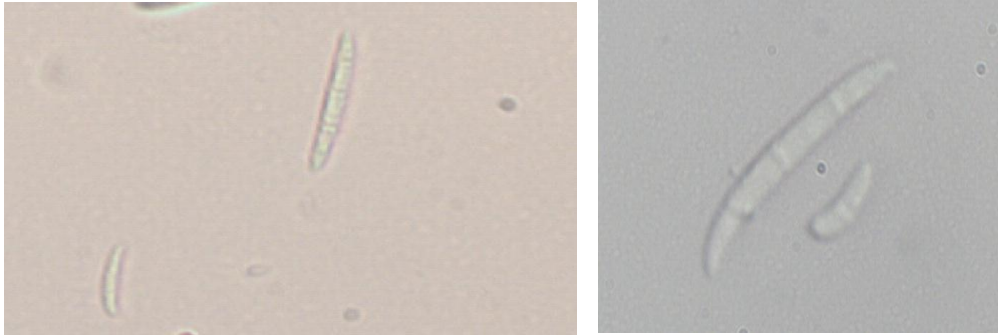


Figura 13 Microconidio y macroconidio de *Fusarium* spp identificadas en cultivos monosporicos realizados a plantas de nochebuena.

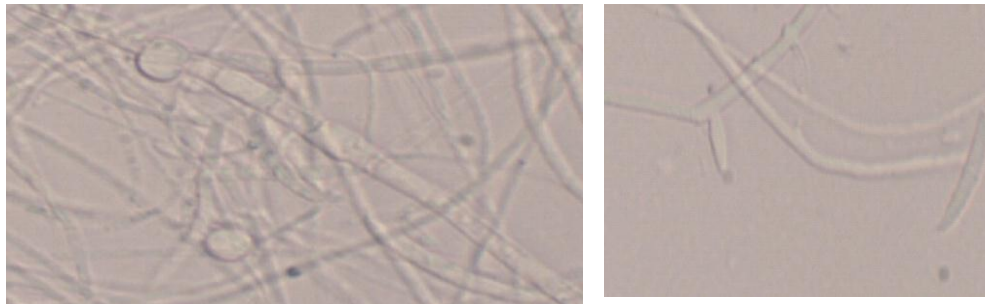


Figura 14 Clamidosporas y filias de *Fusarium* spp observadas en muestras de nochebuena.

De los tres aislamientos resultantes de *Fusarium* spp se realizó el análisis molecular, extrayendo el DNA este se sometió a una evaluación que se realizó por electroforesis para observar la integridad del ADN genómico para las tres cepas aisladas de *Fusarium* spp; 1: Tetela del monte, 2: Jiutepec y 3: Cuautla, y se observó una buena integridad al mostrarse bandas definidas (Figura 15).

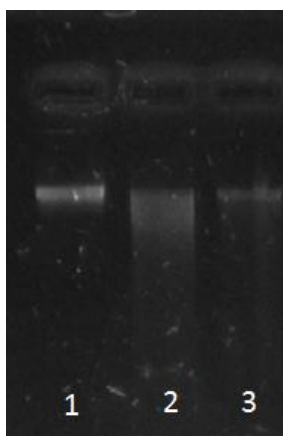


Figura 15 Gel de agarosa que muestra la integridad del DNA de *Fusarium* spp en plantas de nochebuena por electroforesis.

Después de que el ADN se amplió se visualizó y caracterizó según su longitud por electroforesis en el gel de agarosa al 1.2%.

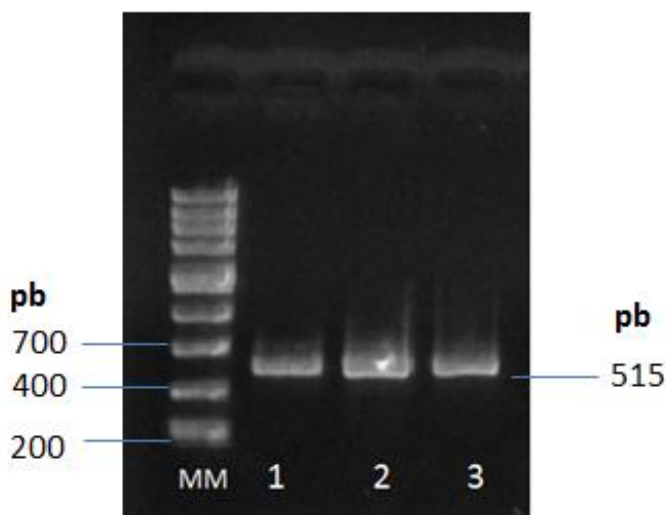


Figura 16 Productos de amplificación por PCR de *Fusarium oxysporum* en plantas de nochebuena. MM (marcador de peso molecular) Zip Ruler™ (Fermentas, Cat.SM1373); banda 1 muestra Tetela del monte; banda 2 muestra Jiutepec; banda 3 Cuautla.

La secuencia de cada uno de los tres aislamientos tuvo una alta homología con las secuencias contenidas en GenBank. Los resultados del BLAST de cada uno de los cuatro aislamientos, arrojaron una identidad del 99% con *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* ([AY188919.1](#)) con la región ribosomal 18S, 5.8S y 28S (Figura 17).

<u>Accession</u>	<u>Description</u>	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	<u>Query coverage</u>	<u>E value</u>	<u>Max Ident</u>
AY188919.1	Fusarium oxysporum f. sp. melonis 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1945	1945	95%	0.0	99%
HQ130708.1	Fusarium sp. WF152 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1938	1938	94%	0.0	99%
HQ130713.1	Fusarium sp. WF157 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1938	1938	94%	0.0	99%

Figura 17 Identificación molecular de *Fusarium oxysporum f. sp. Melonis* en nochebuena.

CONCLUSIONES

Se observó que *Fusarium* spp se caracteriza por producir macroconidios fusiformes, con una célula apical más o menos puntiaguda y una célula basal en forma de pie que constituye la base para la identificación; presenta entre 1-7 septos (Mendoza y Pinto, 1985).

Las colonias de las distintas especies de *Fusarium* spp crecen profusamente, tienen diversos colores (blanco, rosado pálido, rojo, anaranjado, púrpura, celeste, verde aceituna), especialmente en el reverso de la colonia. El micelio es ralo o denso, ya sea algodonoso, como un fieltro, pero en algunos casos es limoso (Seifert, 2002).

Fusarium spp se comporta como fitopatógeno al penetrar las diferentes capas de la corteza de la raíz, hasta encontrar el sistema vascular. Una vez establecido, la colonización de la planta es llevada a cabo rápidamente (Agrios, 2005).

Por lo cual se concluye que las cepas estudiadas pertenecen a la misma especie *Fusarium oxysporum f. sp melonis* identificado en plantas de nochebuena confirmando esta información con la identificación molecular realizada a estas cabe mencionar que solo había una variación en la coloración de cada una de las cepas estudiadas confirmando que *Fusarium oxysporum f. sp melonis* causa marchitez y pudrición radical en cultivos de nochebuena trayendo como consecuencia grandes pérdidas económicas para los productores de este cultivo en el estado de Morelos.

BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. N. 2008. Fitopatología. 2ª edición. Editorial Limusa. México. 856p.
- Albouy, J; D. Jean-Claude. 2000. Enfermedades Producidas por virus de las plantas ornamentales. Etiología de las enfermedades producidas por virus. P.p. 112-113
- Alwadie, H. and Baka A. M. Z. 2003. New records of fungal pathogens of *Euphorbia inarticulata* from aseer region, South-West Saudi Arabia. Archives of Phytopathology and Plant Protection. 36: 195 – 209
- Barnett, H. L. y B. B. Hunter. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. 3a ed. Burgess Publishing Company. Minneapolis, Minnesota, EUA.126-127 p.
- Barnet, H.L., and Hunter, B.B. 1978. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Fourth Edition. MacMillan Pub.Company.New York, USA. 217 p.
- Bolivar Z.F.G. 2007. Fundamentos y casos de la biotecnología moderna. 2ª ed. El Colegio Nacional, México. 69 pp.
- Camacho, R. J. F., Cortéz D. B., García H. G., López V. M. y Plata C. J. 1989.
- Caesar, J. A. 1996. Identity, pathogenicity, and comparative virulence of *Fusarium* spp., related to stand declines of leafy spurge (*Euphorbia esula*) in the northern plains. Plant Dis. 80: 1395–1398
- Caesar, J. A., Campobasso G. and Terragitti G. 1998. Identification, pathogenicity and comparative virulence of *Fusarium* spp. associated with diseased *Euphorbia* spp. in Europe. Biocontrol Science and Technology. 8: 313-319.º
- Conzatti, C. 1988. Flora taxonómica mexicana. Volumen I. Editorial Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. México, D.F. 220 p.
- Daughtrey, L, M., Wick, L, R. and Peterson L, J. 2001. Plagas y Enfermedades de las Plantas en Maceta con Flores. Ediciones Mundi-Prensa. 90 p.
- Ecke, P. Jr., Matkin O. A. and Hartley D. E. 1990. The poinsettia manual. 3rd ed.

Engelhard, A. W. 1983. Chemical control of scab (*Sphaceloma poinsettiae*) on outdoor grown poinsettia plants in Florida. Proceedings of the Florida State Horticultural Society. Soc. 96: 285-287.

Figuroa-Rivera, M.G., Rodríguez-Guerra, R., Guerrero-Aguilar, B.Z., González-Chavira, M.M., y Pons-Hernández, J.L. 2010. Caracterización de Especies de Fusarium Asociadas a la Pudrición de Raíz en Guanajuato, México. Revista Mexicana de Fitopatología 2(28):124-134.

García, A. 2008. Producción de Nochebuena planta terminada. *In: Memoria del 7° Simposium Internacional de Viverismo del 28-31 de agosto de 2008.*; F. Osuna C.; F. García P.; S. Ramírez R.; L. Granada C. y D. Galindo García (eds.). 63-77 pp.

García, P. F.; Ramírez, R. S.; Osuna, C. F. J. y Ocampo, T. 2009. Enfermedades de las principales ornamentales en Morelos. SAGARPA. INIFAP. Campo Experimental Zacatepec. Folleto técnico Núm. 39. 30 p.

Grounds, B. 1965. Poinsettia culture. Agricultural Extension Service. Yuma, Arizona. 4 p.

Kornerup, A., and J. H. Wanscher. 1978. *Methuen Handbook of Color*, 3rd ed. Methuen and Co., London. (12)

Kremer, J. R., Caesar J. A. and Souissi T. 2006. Soilborne microorganisms of Euphorbia are potential biological control agents of the invasive weed leafy spurge. *Applied Soil Ecology*. 32:27–37.

Larson, R. A. 1996. Introducción de la floricultura. 3^{ra} ed. Editorial AGT. D.F., México. 115 p.

Leslie John F. and Summerell Brett A. 2006. The Fusarium Laboratory Manual. Blackwell publishing professional. USA. First edition. Pag 113-118, 213-218.

Martínez, F. 1995. Manual práctico de la producción de nochebuena. Consultora Oasis. Jiutepec, Morelos, México. 87 p.

Mayfield, M. H. 1997. A systemic treatment of *Euphorbia* subgenus *Poinsettia* (Euphorbiaceae). UMI Dissertation Services. 229 p.

Mendoza, Z.C. y Pinto, C.B.1985.Clase-Forma: Deuteromycetes. Principios de Fitopatología y Enfermedades causadas por Hongos.pp.240.Enseñanza e Investigación Parasitología: UACH.

Molina, S.E. 2006.Manejo de plagas del follaje y patógenos de suelo del cultivo de Pascua (*Euphorbia pulcherrima* Willd ex. Klotzsch) para exportación de esquejes, en la empresa Paul Ecke de Guatemala S.A., San Juan Alotenango Sacatepéquez. Universidad de San Carlos de Guatemala. 102 p.

Nelson, P.E., Digna, M.C., and Anaissie E.J.1994. Taxonomy, Biology and Clinical aspects of *Fusarium* species. Clinical Microbiology Reviews 7: 479-504.

Nelson, P. E., T. A. Toussoun, and W. F. O. Marasas.1983. *Fusarium Species: An Illustrated Manual for Identification*. Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania. (P, 2, 8, 9, 11, 12, *anthophilum*, *camptoceras*, *chlamydosporum*, *equiseti*, *lactis*, *merismoides*, *poae*, *proliferatum*, *redolens*, *sacchari*, *sambucinum*, *scirpi*, *semitectum*, *solani*, *sporotrichioides*, *subglutinans*, *succisae*, *tricinctum*, *udum*, *venenatum*, *verticillioides*)

Pascoe, I. G. 1990. *Fusarium* morphology I: Identification and characterization of a third conidial type, the mesoconidium. *Mycotaxon* 37: 121-160. (12)

Rodríguez, C. B. 1985. Botánica sistemática. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 286-287 pp.

Rubin, H. L. 1961. *Poinsettia scab* - a new report for Puerto Rico. Plant Dis Reporter. 45:375

Ruehle, G. D. 1941. *Poinsettia scab* caused by *Sphaceloma*. Phytopathology. 31:947- 948.

SAGARPA. 2011. Consultado en <http://www.presidencia.gob.mx/2009/11/esperan-productores-comercializar-20-millones-de-plantas-de-nochebuena-esta-temporada/> el 04 de julio de 2012

Seifert, A.K. 2002. *Fusarium* and anamorph generis concept. En: *Fusarium* Paul E. Nelson Memorial symposium. Summerell, A. B., Leslie J.F., Backhouse D., Bryden W.L., and Burgess L.W. (Ed). 2^a edition. The American Phytophological Society .St. Paul, Minnesota, U.S.A. 15-28 pp.

Shanks, J. B. 1980. Poinsettias-Nochebuenas. P. 273-295. *In*: Introduction to Floriculture. Larson, R. A. (Ed.). Academic Press. New York. USA.

Sistema de Informacion Agroalimentaria de Consulta. 2012. Consultado en http://www.siap.sagarpa.gob.mx/sistemas/siacon/SIACON_2006.html

Summerell, B. A., B. Salleh, and J. F. Leslie. 2003. A utilitarian approach to *Fusarium* identification. *Plant Disease* 87: 117-128. (P, 11, 12)

Thrane, U. 2001. Developments in the taxonomy of *Fusarium* species based on secondary metabolites, p. 29-49. *In* B. A. Summerell, J. F. Leslie, D. Backhouse, W. L. Bryden, and L. W. Burgess (eds.), *Fusarium: Paul E. Nelson Memorial Symposium*. APS Press, St. Paul, Minnesota. (9, 11, 12)

Toussoun, T. A. y P. E. Nelson. 1976. *Fusarium* A Pictorial Guide to the identification of *Fusarium* species according to the taxonomic system of Snyder and Hansen. Second edition. The Pennsylvania State University. 39 p.

Vidalie, H. 1992. Producción de flores y plantas ornamentales. Segunda edición. Editorial Mundi-Prensa. Madrid, España. 310 p.

Wehlburg, R. 1968. Poinsettia scab. Florida Department of Agriculture. Division of Plant Industry. Plant Pathology Circular No. 65.

White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. 1990. PCR Protocols: A guide to Methods and Applications. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Academic Press, Inc. pp 315-322.

Jenkins, A. E. 1942. Poinsettia scab discovered in Honolulu. Phytopathology. 32:336-337.

Referencias electrónicas

GenBank Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

ANEXO I

Cuadro 1. Secuencias de primers para el género *Fusarium* pss.

Primers	Secuencia	Referencia
ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	White <i>et al.</i> , 1990
ITS4	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	White <i>et al.</i> , 1990