



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**“IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN
MOLECULAR DE LOS HONGOS PATÓGENOS QUE
AFECTAN A *Jatropha curcas* En EL ESTADO DE
YUCATÁN”**

Tesis que presenta

TERESITA DE JESÚS VALENCIA YAH

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida Yucatán, México.
Mayo 2014



CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO



Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado **“IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS HONGOS PATÓGENOS QUE AFECTAN A *Jatropha curcas* En EL ESTADO DE YUCATÁN”** fue realizado en el laboratorio GeMBio del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., bajo la dirección del Dr. Inocencio Higuera Ciapara y co-dirección de la Dra. Daisy de la Caridad Pérez Brito, dentro de la opción biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

Dr. Felipe Augusto Vázquez Flota

Coordinador de docencia

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Mérida, Yucatán, México, Mayo de 2014

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



Teresita de Jesús Valencia Yah

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por estar conmigo en cada paso que doy, por darme salud y fortaleza para seguir adelante, por escucharme y guiarme en todo tipo de circunstancias y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía en los momentos difíciles.

Al Dr. Inocencio Higuera Ciapara, director de esta tesis, por su asesoramiento en la realización de la tesis, por su valioso tiempo, por su apreciable guía académica y por sus relevantes comentarios, sugerencias y observaciones que permitieron mejorar esta investigación.

A mi co-directora, la Dra. Daisy de la Caridad Perez Brito, por permitirme entrar a su grupo de investigación, por su guía y asesoramiento científico, por haberme facilitado el material necesario para los experimentos de esta investigación, por estar pendiente de mi trabajo y por ayudarme en la redacción del documento.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, por abrirme las puertas en busca de más conocimientos y por brindarme el espacio y la infraestructura donde desarrollar este trabajo.

Al laboratorio GeMBio, por proporcionar los equipos necesarios en el desarrollo de esta investigación.

Al CONACYT, por la beca de manutención otorgada para realizar los estudios de maestría. No. de apoyo: 334650.

Al Dr. Raúl Tapia Tussell, por su inestimable ayuda en los temas relacionados a la Biología Molecular, por sus enseñanzas en el ámbito científico-académico, por haber guiado el desarrollo de este trabajo, por su apoyo en la redacción del documento y por todos sus valiosos comentarios que permitieron llegar a la culminación del mismo.

Al M.C. Andrés Felipe de Jesús Quijano Ramayo, por su ayuda en la identificación de los hongos, por su asesoramiento en temas relacionados a los mismos y por todos sus comentarios y críticas constructivas que fueron relevantes para el desarrollo de la tesis.

Al I.Q.I. Alberto Cortés Velázquez, por su apoyo técnico en el laboratorio, por su ayuda en la formación de los grupos morfológicos de los hongos, por sus apreciados y relevantes comentarios y sugerencias en la presentación de esta investigación y por haber contribuido en la redacción del documento de tesis.

A los Ingenieros Rodolfo Martín Mex y Ángel Nexticapán Garcés, por su apoyo en la colecta de material vegetativo, toma de fotos de los síntomas en campo y por su ayuda en los análisis estadísticos de los resultados.

A la L.A.E. Bertha Arely Ramírez González, por su apoyo en el formato electrónico de tesis.

Al M.C. Anuar Ahmed Magaña Álvarez, por su tiempo, ayuda y paciencia en la elaboración de los geles de acrilamida, que fueron de importancia en este trabajo, por sus consejos académicos y por su apoyo en todo momento.

A la M.C. Claudia Guadalupe Torres Calzada, por su ayuda en los temas relacionados a la bioinformática y estadística, por su paciencia y motivación que han sido fundamentales para mi formación, así como también por su amistad y por su compañerismo en el laboratorio.

Al M.C. Erick Alberto Aguilera Cauich, por su asesoramiento en la elaboración de los dendogramas, por su tiempo y disposición para ayudar en cualquier momento y por su amistad.

A la IBQ. Rosa Antonina Kancab Uc, por su ayuda desinteresada en todo momento, por su paciencia y dedicación en la toma de fotografías de los hongos de esta tesis y por su apoyo en las pruebas de patogenicidad.

Al Ing. Otilio Matu Cantú por su ayuda en la siembra de las plantas y por su apoyo en la toma de fotografías de los conidios.

A Fernando Contreras Martín, Francisco Javier González Xool y Rafael Chan Balam por su apoyo en el mantenimiento de las plantas en el invernadero.

A mi comité tutorial conformado por el Dr. Inocencio Higuera Ciapara, la Dra. Daisy de la Caridad Pérez Brito, la Dra. Cecilia Mónica Rodríguez y la Dra. Sara Elena Solís Pereira, por su apreciable tiempo en cada tutorial y por todas sus aportaciones y recomendaciones científicas para el desarrollo de esta tesis.

A mi comité revisor conformado por el Dr. Inocencio Higuera Ciapara, la Dra. Daisy de la Caridad Pérez Brito, la Dra. Cecilia Mónica Rodríguez, la Dra. Sara Elena Solís Pereira y el Dr. Raúl Tapia Tussell, por su dedicación en la revisión de la tesis, por sus observaciones, por todas sus aportaciones científicas que permitieron que esta tesis llegue a su culminación y por sus sugerencias que contribuyeron al mejoramiento y ordenamiento del presente trabajo.

A todos mis amigos y compañeros de laboratorio Claudia Guadalupe Torres Calzada, Erick Alberto Aguilera Cauich, Abril de Jesús Díaz Braga, Anuar Ahmed Magaña Alvarez, Edgar Gamaliel Itzá Kuk, Rubí del Rosario Chablé Villacís y Emy Guadalupe Huchim Poot, por el ambiente de trabajo creado, por el tiempo que dedicaron en ayudarme y por su compañía en todo momento.

A todos y cada uno de mis maestros, por sus enseñanzas y experiencias compartidas, por su tiempo y por su apoyo en el desarrollo de mi formación profesional.

A mis compañeros de generación: Sara Hernandez, Rosa Gómez, Deysi Medrano, Daniel Leal, Jorge Espadas, Rafael Sánchez, Ileana Carrillo y Laura Espinosa, por su apoyo en las asignaturas y por su visión, motivación y optimismo que han sido de mucha ayuda en los momentos críticos de la tesis.

A Ileana Carrillo Segura y Laura Espinosa Barrera con quienes he compartido estos dos años de tesis, y de quienes he recibido apoyo incondicional tanto en la vida personal como en mi formación profesional. Gracias por su amistad y por los buenos consejos.

A los que nunca dudaron que lograría este triunfo: Angel Alberto Tzec Mejía, Edwin Díaz May, Julian Anselmo Nah Kantum, y Ernesto Pat Yah, quienes a pesar de la distancia siempre estuvieron dispuestos a ayudarme, por todas sus palabras de aliento y las ganas de regalarme horas e incluso días para terminar mis pendientes.

Al Dr. Lizandro Peraza Flores, por su amistad y por ayudarme a descargar artículos de difícil acceso.

A mis padres, Jaime Valencia Mis y Eugenia Yah May, a quienes les debo todo, por su apoyo incondicional en todos los momentos de mi vida, por darme todo lo que soy como persona y por ayudarme con los recursos necesarios para que yo estudie.

A mis hermanos, Margarita, Aurora, Gloria y Jaime, por su cariño, apoyo, y confianza que siempre han depositado en mí, por motivarme y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba.

A mis sobrinos, César, Cecilia, Lisa, Emily, Abril, Antonio, Luis, Zarety, Jonathan, Marely, Daniela y Lizet, por ser mi motivación, inspiración y felicidad.

A mi otra familia, Yulissa Dzib Gutiérrez, Ileana Carrillo Segura, Ximena Galaviz Segura y Raúl Carrillo Segura, por permitirme tener un hogar al cual llegar todos los días, por su apoyo de siempre y por su amistad.

Y por último y no menos importante, a mi novio Anuar, a quién le agradezco por su apoyo incondicional, comprensión, paciencia y amor. Por estar conmigo en las buenas en las malas y en las peores, dandome ánimos de fuerza y valor para seguir adelante. Por creer en mí y por ser mi ejemplo a seguir. Sin duda eres lo mejor que tengo y tu ayuda en todas las etapas de la maestría son impagables.

Con absoluta sinceridad, mi agradecimiento a todos los que hice mención ya que con su aporte hicieron posible esta tesis. ¡Gracias!

DEDICATORIA

Con cariño y amor, a mis padres, quienes me han apoyado en todo momento y que con su ejemplo, trabajo y dedicación me enseñaron desde pequeña a luchar para alcanzar mis metas.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
ÍNDICE DE CUADROS.....	vii
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES.....	3
1.1 Origen y distribución de <i>Jatropha curcas</i>	3
1.2 Importancia económica del cultivo	4
1.3 Clasificación taxonómica.....	5
1.4 Descripción botánica.....	6
1.5 Plagas y enfermedades.....	7
1.5.1 Plagas	7
1.5.2 Enfermedades	8
1.6 Generalidades de los hongos.....	9
1.7 Hongos fitopatógenos	10
1.8 Identificación y caracterización morfológica	11
1.9 Identificación molecular.....	11
1.10 Variabilidad genética en hongos.....	15
JUSTIFICACIÓN	17
HIPÓTESIS.....	18
OBJETIVOS.....	18
Objetivo general.....	18
Objetivos específicos.....	18
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	19
REFERENCIAS.....	20
CAPÍTULO II. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS HONGOS ASOCIADOS A <i>J. curcas</i>	35
2.1 INTRODUCCIÓN	35
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	36
2.2.1 Área de estudio y colecta de material	36
2.2.2 Aislamiento de los hongos.....	36
2.2.3 Purificación de los hongos.....	37
2.2.4. Identificación a nivel de género.....	37
2.2.5. Caracterización morfológica	38
2.2.5.1 Características de las colonias	38
2.2.5.2 Características de las esporas.....	38

2.2.6. Análisis estadístico	39
2.2.7. Pruebas de patogenicidad (Postulados de Koch)	39
2.3 RESULTADOS	41
2.3.1 Aislamiento e identificación de hongos	41
2.3.2 Caracterización morfológica	46
2.3.3 Pruebas de patogenicidad	52
2.3.3.1 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	52
2.3.3.2 <i>Fusarium</i> sp.	54
2.3.3.3 <i>Alternaria</i> sp.	55
2.3.3.4 <i>Lasiodiplodia</i> sp.	56
2.4 DISCUSIÓN	57
2.5 REFERENCIAS	60
CAPÍTULO III. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS HONGOS ASOCIADOS A <i>J. curcas</i>	65
3.1 INTRODUCCIÓN	65
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	66
3.2.1 Extracción del ADN genómico	66
3.2.2 Identificación con iniciadores específicos	67
3.2.3 Secuenciación	67
3.2.3.1 Amplificación de la región de ITS y el gen 5.8S	67
3.2.4 Caracterización molecular	68
3.2.4.1 PCR-RFLP	68
3.2.4.2 AP-PCR	68
3.2.5 Análisis filogenético	69
3.3 RESULTADOS	70
3.4 DISCUSIÓN	91
3.5 REFERENCIAS	93
CAPÍTULO IV. DISCUSION GENERAL Y CONCLUSIONES	97
4.1 DISCUSIÓN GENERAL	97
4.2 CONCLUSIONES	101
4.3 PERSPECTIVAS	103
4.4 REFERENCIAS	104
ANEXOS	109

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de <i>Jatropha curcas</i> en el mundo.....	3
Figura 2. Municipios muestreados en el Estado de Yucatán.	36
Figura 3. Lesiones observadas en a) hoja b) fruto c) raíz y d) brote apical de <i>Jatropha curcas</i>	41
Figura 4. a) Conidios de <i>C. gloeosporioides</i> y b) conidios de <i>C. capsici</i>	44
Figura 5. a) Macro y b) microconidios de <i>Fusarium</i> sp.	44
Figura 6. Conidios de <i>Alternaria</i> sp.	45
Figura 7. a) conidios inmaduros y b) conidios maduros de <i>Lasiodiplodia</i> sp.	45
Figura 8. Morfotipos de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> a los 7 días de edad. a) anverso y b) reverso de la placa.	46
Figura 9. Morfotipos de <i>Fusarium</i> sp. a los 4 días de edad. a) anverso y b) reverso de la placa.	48
Figura 10. Morfotipos de <i>Alternaria</i> sp. a los 6 días de edad. a) anverso y b) reverso de la placa.	50
Figura 11. Morfotipos de <i>Lasiodiplodia</i> sp. a los 2 días de edad a) anverso y b) reverso de la placa.	52
Figura 12. Plantas de <i>Jatropha curcas</i> : a) testigo, b) inoculada con <i>C. gloeosporioides</i>	53
Figura 13. a) Acérvulos en hoja; b) conidios de <i>C. gloeosporioides</i> reaislados de las lesiones.	53
Figura 14. Planta de <i>Jatropha curcas</i> : a) testigo, b) inoculada con <i>Fusarium</i> sp.	54
Figura 15. Conidios de <i>Fusarium</i> sp. reaislados en lesiones de <i>J. curcas</i>	54

Figura 16. Planta de <i>J. curcas</i> : a) testigo, b) planta inoculada con <i>Alternaria</i> sp. hojas con manchas oscuras, y micelio blanco en lesiones de hoja.	55
Figura 17. Conidios de <i>Alternaria</i> sp. reaislados de lesiones de <i>J. curcas</i>	55
Figura 18. Plantas de <i>J. curcas</i> : a) Testigo y b) planta inoculada con <i>Lasiodiplodia</i> sp., mostrando los primeros síntomas, c) lesión en el tallo de la planta inoculada	56
Figura 19. a) Conidios inmaduros y c) conidios maduros de <i>Lasiodiplodia</i> sp.	56
Figura 20. Productos de amplificación con el par de iniciadores CgInt/ITS4 para identificar a <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> . MM: Marcador molecular 1 Kb plus.	70
Figura 21. Productos de amplificación de la región ITS de <i>Fusarium</i> sp., <i>Lasiodiplodia</i> sp., y <i>Alternaria</i> sp. MM: Marcador molecular 1Kb plus.	71
Figura 22. Árbol filogenético derivado del análisis UPGMA basado en la secuenciación de la región ITS del ADNr de los hongos bajo estudio.	73
Figura 23. Perfiles de restricción generados con <i>AluI</i> , <i>HaeIII</i> , <i>HindIII</i> , <i>MspI</i> , <i>RsaI</i> y <i>TaqI</i> para <i>Alternaria alternata</i> . MM: Marcador molecular 1 Kb plus.	74
Figura 24. Perfiles de bandas de <i>Alternaria alternata</i> obtenidas con los iniciadores MR, (TCC) ₅ y (GACAC) ₃ . MM: marcador molecular 1Kb plus.	76
Figura 25. Dendograma obtenido por UPGMA, basado en el análisis de los datos de todos los iniciadores con los aislados de <i>Alternaria alternata</i>	77
Figura 26. Perfiles de restricción generados con las enzimas <i>MspI</i> , <i>AluI</i> , <i>MspI</i> y <i>TaqI</i> para <i>Fusarium solani</i> (JG2), <i>Fusarium equiseti</i> (JG3-JG66) y <i>Fusarium decemcellulare</i> (JG67). MM: Marcador molecular 1 kb plus.	78
Figura 27. Patrones de bandas de las especies de <i>Fusarium</i> obtenidos con los iniciadores (GACAC) ₃ y MR. MM: Marcador molecular 1Kb plus. JG2: <i>Fusarium solani</i> ; JG3-JG66: <i>Fusarium equiseti</i> y JG67: <i>Fusarium decemcellulare</i>	80

Figura 28. Dendograma obtenido por UPGMA, basado en el análisis de los datos de todos los iniciadores con los aislados de *Fusarium*. 82

Figura 29. Perfiles de restricción generados con las enzimas *AluI*, *HaeIII*, *MspI*, *RsaI* y *TaqI* para *Lasiodiplodia theobromae*. MM: Marcador molecular 1 kb plus. 83

Figura 30. Patrones de bandas de *Lasiodiplodia theobromae* con todos los iniciadores. MM: Marcador molecular 1Kb plus. 84

Figura 31. Dendograma obtenido por UPGMA, basado en el análisis de los datos de todos los iniciadores con los aislados de *Lasiodiplodia theobromae*. 85

Figura 32. Perfiles de restricción generados con las enzimas *AluI* y *HaeIII* para *Colletotrichum gloeosporioides*. MM: Marcador molecular 1 Kb plus. 86

Figura 33. Patrones de bandas de *Colletotrichum gloeosporioides* obtenidos con el iniciador (CAG)₅ y MR. MM: marcador molecular 1Kb plus. 88

Figura 34. Dendograma obtenido por UPGMA, basado en el análisis de los datos de todos los iniciadores con los aislados de *Colletotrichum gloeosporioides*. 90

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Principales plagas que afectan a <i>Jatropha curcas</i>	7
Cuadro 2. Principales enfermedades virales en <i>Jatropha curcas</i>	8
Cuadro 3. Principales enfermedades bacterianas en <i>Jatropha curcas</i>	8
Cuadro 4. Principales enfermedades fungosas en <i>Jatropha curcas</i>	9
Cuadro 5. Aislados fungosos de <i>Jatropha curcas</i> obtenidos en este estudio.	42
Cuadro 6. Características morfológicas de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	47
Cuadro 7. Características morfológicas de <i>Fusarium</i> sp.	49
Cuadro 8. Características morfológicas de <i>Alternaria</i> sp.	51
Cuadro 9. Características morfológicas de <i>Lasiodiplodia</i> sp.	51
Cuadro 10. Aislados secuenciados en este estudio.	71
Cuadro 11. Longitud de los fragmentos de restricción obtenidos por PCR-RFLP para <i>Alternaria alternata</i>	74
Cuadro 12. Patrón de huellas genéticas obtenidas por AP-PCR para las cepas de <i>Alternaria alternata</i>	76
Cuadro 13. Longitud de los fragmentos de restricción obtenidos por PCR-RFLP para <i>Fusarium solani</i> , <i>Fusarium equiseti</i> y <i>Fusarium decemcellulare</i>	79
Cuadro 14. Patrón de huellas genéticas obtenidas por AP-PCR para las cepas de <i>Fusarium</i> sp.	81
Cuadro 15. Longitud de los fragmentos de restricción obtenidos por PCR-RFLP para <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	83

Índice

Cuadro 16. Patrón de huellas genéticas obtenidas por AP-PCR para las cepas de <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	85
Cuadro 17. Longitud de los fragmentos de restricción obtenidos por PCR-RFLP para <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	87
Cuadro 18. Patrón de huellas genéticas obtenidas por AP-PCR, para los aislados de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	89

RESUMEN

A nivel mundial *Jatropha curcas*, ha ganado importancia por su potencial para la producción de biodiesel. Aunque se considera una planta resistente a plagas y enfermedades, en otros países se ha reportado que diversos patógenos, entre los que destacan los hongos, afectan su producción. En los últimos años en Yucatán se han establecido grandes extensiones de esta especie, pero el cultivo no ha sido redituable debido a las grandes pérdidas ocasionadas por problemas fitosanitarios, de ahí la importancia del presente estudio. Se realizaron colectas en las diferentes zonas productoras de la Península de Yucatán, para llevar a cabo una caracterización polifásica de los patógenos fungos que afectan a *Jatropha*. Se identificaron a nivel de género por claves morfológicas a *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Alternaria* sp., y *Lasiodiplodia* sp. Las pruebas de patogenicidad demostraron que todos estos aislados están involucrados en las enfermedades de este cultivo. Mediante la secuenciación de la región ITS, se identificaron las especies *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium solani*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium decemcellulare*, *Alternaria alternata*, y *Lasiodiplodia theobromae*. La caracterización de las mismas se llevó a cabo utilizando las técnicas PCR-RFLP y AP-PCR. La primera sólo mostró polimorfismos a nivel de especie pero no intraespecíficamente. La segunda mostró un alto nivel de diversidad genética de estos patógenos inter e intra específicamente, lo que permitió establecer la huella genética de cada cepa. La información generada en este estudio, es de gran importancia pues es el primer reporte generado sobre la diversidad genética de hongos fitopatógenos que afectan la producción de *Jatropha curcas* en México, lo cual permitirá el manejo fitosanitario biorracional de este cultivo.

ABSTRACT

Jatropha curcas has gained worldwide importance due to its potential for biodiesel production. Although it is considered pest and disease resistant, in some countries, reports have been made on several pathogens affecting the production of this crop, among them, the most known fungi. In recent years, in Yucatan, Mexico, the crop in large areas planted to this specie, had not been profitable due to large losses by phytosanitary problems, hence the importance of this study. Plant material from the different producing areas in the Yucatan Peninsula was collected to conduct a polyphasic characterization of fungal pathogens affecting *Jatropha*. Fungi were identified to genus level by morphometric keys to *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Alternaria* sp., and *Lasiodiplodia* sp. Pathogenicity tests showed that all of these isolates are involved in the diseases of the crop. The species *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium solani*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium decemcellulare*, *Alternaria alternata* and *Lasiodiplodia theobromae* were identified by sequencing the ITS region. The characterization of the same was carried out using the PCR-RFLP and AP-PCR techniques. The first only showed polymorphism at species level but not intra-specifically. The second showed a high level of genetic diversity of these pathogens inter-species and intra-specifically, thereby allowing to establish the genetic fingerprint of each strain. The results of this study are very important, because it is the first report generated on genetic diversity of phytopathogenic fungi that affecting the production of *Jatropha curcas* in Mexico, allowing a rational biological management of this crop plant.

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial se ha presentado un incremento constante en el consumo de petróleo, debido a que es utilizado en la mayoría de los sistemas de transporte en muchos países; esto ha traído como consecuencias, la reducción de las reservas energéticas y el incremento de las emisiones de gases efecto invernadero (Agarwal, 2007; Randelli, 2008). Esta demanda creciente de energía, la posibilidad del agotamiento de los combustibles fósiles y la preocupación por el cambio climático, han orillado a buscar nuevas fuentes de energía que sean renovables y amigables con el ambiente (Reddy y Pamidimarri, 2010). Particularmente, los estudios se han enfocado en el biodiesel, por sus ventajas de ser biodegradable, no daña al ambiente, se puede convertir de forma gradual y satisfactoria en un sustituto del diesel mineral, no contiene azufre y no es corrosivo (Pabón, 2009).

Entre los cultivos con potencial para la elaboración de biocombustibles, *Jatropha curcas* (o piñón como también es conocido en México), ha ganado mucha importancia como la más prometedora fuente de semillas oleaginosas, pues no se destina al consumo humano y tiene un alto contenido de aceite, que es susceptible de ser transformado a biodiesel (Ovando-Medina *et al.*, 2011). Debido a este reconocimiento y por todas sus buenas características como cultivo, pero más aún porque se evita el dilema de “combustibles vs alimentos” (Reddy y Pamidimarri, 2010), se ha generado una fuerte oleada de interés hacia la inversión en su producción en muchos países y por lo tanto, el número de plantaciones en los países tropicales ha ido en aumento (GEXSI, 2008).

En México, desde el 2007, se está impulsando el “Programa Nacional de Introducción de Bioenergéticos”, de tal forma que varias comunidades en el estado de Michoacán y otros estados de la República han plantado *J. curcas* con ayuda de subsidios del Gobierno Federal y el apoyo de la iniciativa privada (Hinojosa y Skutsch, 2011). Tan sólo en el país se han detectado tres proyectos para el cultivo de *Jatropha* en donde los más importantes actores son los Gobiernos de los Estados de Chiapas, Sinaloa y Michoacán. Los Gobiernos de Michoacán y Chiapas han puesto en marcha dos proyectos ambiciosos, cada uno de ellos con el objetivo de 120,000 ha para el 2015. En Sinaloa, la Fundación Produce Sinaloa estableció una plantación piloto de 5 ha y está conduciendo estudios de factibilidad para establecer una planta de procesamiento de biodiesel en la región (GEXSI

2008). También varias empresas privadas están contemplando proyectos en Michoacán, Guerrero, Chiapas, Oaxaca, Yucatán y Veracruz; además existen iniciativas locales de universidades en diversas partes del país para el cultivo de esta especie (Cifuentes-Jara y Fall, 2009). Como es el caso del Estado de Yucatán, en donde se encuentran establecidas varias empresas que han invertido en este cultivo para la producción de biocombustibles (Ancona, 2011; Kuo, 2010).

Sin embargo, un hecho importante es que al establecerse monocultivos a gran escala de *J. curcas* para la obtención de biodiesel, los problemas fitosanitarios de este cultivo han aumentado (Nielsen, 2009) de tal manera, que a nivel mundial se han reportado un gran número de insectos plaga y enfermedades, cuya importancia radica en que reducen la producción de los cultivos (Tewari, 2007; Fu *et al.* 2007; Aswatha *et al.*, 2006; Benge, 2006). En particular, las enfermedades causadas por los hongos constituyen una gran amenaza en la producción, debido a que provocan el aborto de flores y frutos, causan daños en las hojas (lo que ocasiona la reducción de su desarrollo) y también afectan las partes radicales pudiendo ocasionar la muerte de las plantas (AEA, 2006).

Debido a que en Yucatán ya se encuentran establecidas plantaciones de esta especie, que abarcan en su totalidad casi 5,000 ha, y a que no existe información de las enfermedades fungosas asociadas a este cultivo en la región, este trabajo de investigación se orientó a la identificación y caracterización de los hongos patógenos que afectan a *J. curcas*, para en el futuro recomendar estrategias de manejo que permitan mantener a las plantas en buenas condiciones durante su cultivo y de esta forma propiciar la obtención de altos rendimientos con vista a la elaboración de biodiesel.

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

1.1 Origen y distribución de *Jatropha curcas*

Jatropha curcas, es una planta cuyo centro de origen ha generado muchas controversias entre los investigadores. Algunos de ellos la identifican como originaria de Centroamérica (Woods y Estrin, 2007; Heller, 1996) mientras que otros mencionan que es de América del Sur (Dorado, 2008). Sin embargo, es muy probable que su centro de distribución sea México, debido a que en este país se le ha encontrado creciendo en una gran variedad de ambientes, que van desde bosques hasta las regiones costeras (Heller, 1996).

Se cree que fue llevada al Caribe por los navegantes portugueses en el siglo XVI, desde donde se extendió hacia los países de África y Asia como Indonesia, Malasia y Filipinas, como planta para cercar (Woods y Estrin, 2007; Heller, 1996). En la actualidad se encuentra ampliamente expandida por todo el mundo, especialmente en las zonas cálidas. Está presente en forma silvestre o cultivada en casi toda Centro América, África del Sur y en el continente Asiático específicamente en la India y el Medio Oriente (Fig. 1) (Pabón, 2009).



Figura 1. Distribución de *Jatropha curcas* en el mundo.

En México, *J. curcas*, se encuentra extensamente distribuida, de tal manera que puede ser encontrada en más de 15 estados de forma silvestre. Las condiciones climáticas que el país posee son adecuadas para sembrar *J. curcas*; Núñez-Colín y Goytia-Jiménez (2009) y México es el único país en donde se hallan las variedades tóxicas y no tóxicas (Makkar y Becker, 2009). Los estados de Guerrero, Michoacán y Chiapas poseen más del 90% de la *Jatropha* tóxica, mientras la *Jatropha* no tóxica se encuentra en los estados de Puebla y Veracruz (Martínez *et al.*, 2010). Debido a que en estos dos estados se encuentran las variedades no tóxicas *Jatropha*, las semillas son consumidas por los humanos después de tostar y en la preparación de platillos tradicionales (Makkar *et al.*, 1998).

1.2 Importancia económica del cultivo

Jatropha curcas es una planta multipropósito con numerables atributos valiosos y considerable potencial económico. En la medicina tradicional, varias partes de la planta (raíces, tallos, hojas, semillas y frutos) han sido utilizadas para el tratamiento de muchas enfermedades, en forma fresca o en preparaciones (Pabón, 2009). Por ejemplo, de sus hojas se preparan infusiones que son utilizadas contra la tos y después del parto como antiséptico, o también la infusión puede ser utilizada como insecticida (Kaushik *et al.*, 2006). Mientras que sus frutos son empleados para el tratamiento de enfermedades como la disentería, las hemorroides, la gonorrea, la infertilidad y enfermedades de la piel (Akintayo, 2004).

Del tallo se extrae látex, que contiene un alcaloide llamado "jatrophina", el cual se cree que tiene propiedades anticancerígenas y es utilizado en aplicaciones externas en las enfermedades de piel y reumatismo (Thomas *et al.*, 2008). El aceite tiene una fuerte acción purgativa y es ampliamente usado para tratar las enfermedades de la piel y para calmar el dolor. Por otro lado, debido a su alto contenido de aceite, aproximadamente 55% (Pabón, 2009), las semillas son usadas en la India y otros países para la elaboración de jabones. También debido a esto, en años recientes las semillas han llamado la atención como materia prima para la elaboración de combustibles para motores con una alta viabilidad económica (Chen *et al.*, 2006).

Alternativamente a la utilización de esta planta como medicina, repelente de insectos, para la elaboración de jabones o biodiesel, los subproductos que se generan, se utilizan en la fabricación de pinturas y barnices. La torta, producto de la extracción de aceite es un excelente abono para la recuperación de suelos, como también lo son sus hojas y la corteza de sus frutos. En muchas comunidades rurales de América tropical, la planta ha sido utilizada tradicionalmente para la construcción de cortinas rompe vientos y cercos vivos para evitar el paso de animales a los huertos (Andrade, 2009).

1.3 Clasificación taxonómica

De acuerdo a Cronquist (1981), la clasificación taxonómica de *Jatropha curcas* L. es la siguiente:

Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Euphorbiales</i>
Familia	<i>Euphorbiaceae</i>
Género	<i>Jatropha</i>
Especie	<i>Jatropha Curcas</i> L.

Es pariente cercana de la Higuera (*Ricinus communis*), la yuca (*Manihot esculenta* Crantz) y el árbol de hule (*Hevea brasiliensis*) (Alfonso, 2008; Woods y Estrin, 2007).

1.4 Descripción botánica

Jatropha curcas es un arbusto grande, perenne, de crecimiento rápido, cuyo ciclo de vida se extiende entre los 45 y 50 años. Tiene una altura normal de 2 a 3 metros, aunque puede superar los 5 metros, de acuerdo a las condiciones en que se encuentre (Pabón, 2009; Alfonso, 2008). Presenta raíces cortas, poco profundas, formadas normalmente por cinco raíces, una principal o central (pivotante) y cuatro periféricas (Pabón, 2009; Alfonso, 2008; Heller, 1996). Su tallo es un cilindro delgado, de aproximadamente 20 cm de diámetro, su corteza es lisa de color verde amarillento y presenta ramificaciones a poca altura de donde salen las hojas (Pabón, 2009; Alfonso, 2008).

Las hojas son palmeadas, de color verde en el haz y verde claro en el envés; son amplias (6 a 15 cm) y brillantes, formadas con 5 a 7 lóbulos acuminados poco profundos (Pabón, 2009; Alfonso, 2008). Se encuentran sostenidas por grandes pecíolos de 10 a 15 cm de longitud y se colocan de forma alterna o subalterna opuesta en la rama. Presentan nervaduras blanquecinas, salientes en el envés y son caducifolias, pues caen durante la época de sequía. Las inflorescencias son racimosas, se forman en la posición terminal de las ramas, entre las axilas formadas por las hojas y ramas (Pabón, 2009). Contiene flores unisexuales y ocasionalmente hermafroditas; ambas flores, masculinas y femeninas se forman en la misma planta y en la misma inflorescencia, por lo que se dice que es una planta monoica (Chang-Wei *et al*, 2007; Bhattacharya *et al*, 2005; Raju, 2002).

Los frutos son ovoides de aproximadamente 25 mm de largo y para su desarrollo se necesitan de 90 días (desde la floración hasta que madura la semilla) (Pabón, 2009). En un principio son de color verde, pero a medida que maduran se vuelven de color amarillo; cuando se secan adquieren un color café oscuro o negro, son dehiscentes y contienen a las semillas (Alfonso, 2008). Las semillas son de color negro con un tamaño aproximado de 2 cm por 1 cm y contienen un alto contenido de aceite (55%) (Pabón, 2009). Entre sus principales ácidos grasos se encuentran el ácido mirfístico (0-0.5%), ácido palmítico (12-17%), ácido esteárico (5-6%), ácido oleico (37-63%) y el ácido linoleico (19-40%) (Dorado, 2008).

1.5 Plagas y enfermedades

Las plagas y enfermedades no constituyen un problema en las plantas cuando se encuentran en estado silvestre; sin embargo; como es de esperarse de cualquier tipo de monocultivo, los grandes campos de *Jatropha curcas* son susceptibles a las plagas y enfermedades (Banjo *et al*, 2006; Regupathy y Ayyasamy, 2006; Shanker y Dhyani, 2006).

1.5.1 Plagas

Las plagas más frecuentes son *Pachycoris klugii* y *Leptoglossus zonatus* que causan abortos en frutos y malformaciones en las semillas (De la Vega, 2008). Entre otras plagas se incluye *Lagocheirus undatus* que perfora los tallos de las plantas así como también grillos, hormigas y orugas que se alimentan de las hojas (Cuadro 1).

Cuadro 1. Principales plagas que afectan a *Jatropha curcas*.

Nombre común	Nombre científico
Chinches	<i>Leptoglossus zonatus</i> ^{1,2} <i>Pachycoris Klugii</i> ^{1,2} , <i>Lagocheirus undatus</i> <i>Proxis puntulatus</i> ¹
Ácaros	<i>Polyphagotarsonemus latus</i> ³ <i>Tetranychus</i> sp. ³
Chicharrita verde	<i>Empoasca</i> sp. ³
Hormigas	<i>Atta cephalotes</i>
Escarabajos	<i>Bostrichus</i> sp.
Mosca blanca	<i>Bemisia tabaci</i> , <i>Trialeurodes vaporariorum</i>
Langosta	<i>Oedaleus senegalensis</i> ⁴
Gusano soldado	<i>Spodoptera frugiperda</i>
Trips	<i>Thrips tabaco</i>
Piojo harinoso	<i>Ferrisia virgata</i>

Fuente: 1.- González *et al.*, (2011) 2.- De la Vega (2008). 3.- De Siqueira y Gabriel (2008). 4.- Heller (1996).

1.5.2 Enfermedades

Aunque *Jatropha curcas* ha sido considerada una planta resistente a enfermedades, en muchos países se han registrado diversos patógenos infectándola, o que han afectado a otras especies del mismo género (Saturnino *et al.*, 2005). De acuerdo a los reportes, las principales enfermedades son causadas por virus, bacterias y hongos. En el cuadro 2 se enlistan algunas enfermedades causadas por virus.

Cuadro 2. Principales enfermedades virales en *Jatropha curcas*.

Agente causal	Síntomas
<i>Jatropha mosaic virus</i>²	Mosaico amarillo, hojas deformadas con reducción de tamaño, engrosamiento de las venas, ligero enanismo de las plantas.
<i>Cassava mosaic virus</i>¹	Mosaico severo, reducción de tamaño de la hoja, retraso en el crecimiento de plantas.
<i>African cassava mosaic virus</i>²	Mosaico, deformación de hojas, reducción de tamaño de las planta.
<i>Cucumber mosaic virus</i>¹	Mosaico amarillo

Fuente. 1.- Raj, *et al.*, (2008).) 2.- De Siqueira y Gabriel (2008).

Las enfermedades bacterianas reportadas se encuentran en el cuadro 3.

Cuadro 3. Principales enfermedades bacterianas en *Jatropha curcas*.

Enfermedad	Agente causal
Pudrición de raíz	<i>Erwinia</i> spp.
Pudrición de tallos	<i>Erwinia</i> spp.
Mancha angular	<i>Xanthomonas</i> sp.

Fuente: González *et al.*, (2011).

Las enfermedades fungosas más frecuentes son causadas por los hongos *Colletotrichum capsici*, *Colletotrichum gloeosporioides* *Pythium* spp., *Alternaria* spp. y *Fusarium* spp. (Cuadro 4). Los hongos que atacan la parte radicular como lo hacen *Fusarium* spp. y *Rhizoctonia* spp., pueden causar la muerte de la planta.

Cuadro 4. Principales enfermedades fungosas en *Jatropha curcas*.

Enfermedad	Agente causal
Pudrición de raíz	<i>Fusarium</i> spp. ^{7,11} <i>Lasiodiplodia theobromae</i> ^{8,9,10} <i>Rhizoctonia</i> sp.
Pudrición de tallo	<i>Fusarium</i> spp. ^{4,13}
Antracnosis	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ^{1,2,3,12} , <i>Colletotrichum capsici</i> ^{1,2,3,6}
Cenicilla	<i>Oidium</i> sp. ⁵
Tizón de inflorescencia	<i>Alternaria alternata</i> ¹⁴
Pudrición de frutos	<i>Alternaria alternata</i> ¹⁵
Mancha foliar	<i>Cercospora</i> sp. ^{4,5} , <i>Curvularia</i> sp. ^{4,5}
Royas	<i>Phakopsora arthuriana</i> ²
Muerte descendente	<i>Fusarium</i> spp. ¹²
Gomosis	<i>Lasiodiplodia theobromae</i> ⁸

Fuente: 1.- González *et al.*, (2011) 2.- De Siqueira y Gabriel (2008) 3.- Freire y Parente (2006) 4.- Orrego (2008). 5.- Garcete *et al.*, (2009) 6.-Torres-Calzada *et al.*, (2011) 7.- Kaushik *et al.*, (2001) 8.- Fu *et al.*, (2007) 9.- Latha *et al.*, (2009) 10.- Pereira *et al.*, (2009) 11.- Heller (1996) 12.- Jin-Hyeuk *et al.*, (2012). 13.- Zarafi y Abdulkadir (2012); 14.- Espinoza-Verduzco *et al.*, (2012), 15.- Kumar *et al.*, (2012).

1.6 Generalidades de los hongos

Los hongos pertenecen al reino Fungi, constituido por aproximadamente 250,000 especies (Dunlap *et al.*, 2007). Son organismos eucariotas, carecen de clorofila, y sus paredes celulares contienen quitina, β glucanos, mananos y celulosa (Agrios, 2005). Pueden ser unicelulares como las levaduras o pluricelulares como los mohos y se reproducen tanto sexualmente o asexualmente por esporas, aunque también se pueden reproducir asexualmente a partir de fragmentos de micelio. (Blackwell *et al.*, 2009). En la naturaleza se pueden encontrar en una deslumbrante variedad de tamaños, formas y colores (Blackwell, 2011; Desjardin *et al.*, 2010; Lutzoni *et al.*, 2004). La mayoría de las especies conocidas de hongos, son estrictamente saprófitas y viven sobre la materia orgánica muerta, a la que descomponen. Se considera que cerca de 8,000 especies de hongos son las que producen enfermedades en las plantas, y cada hongo parásito puede atacar a una o más especies de plantas (Agrios, 2005). Otros viven en una relación de

simbiosis con algún organismo huésped, así hay hongos micorrizales que están asociados con las raíces de las plantas y facilitan la absorción de nutrientes por la misma. (Blackwell, 2011; Hanson, 2008; Taylor *et al.*, 2004). Las unidades básicas estructurales de la mayoría de los hongos son filamentos conocidos como las hifas, que al agruparse forman el micelio. Los hongos macroscópicos desarrollan estructuras complejas fácilmente observables conocidas como cuerpos fructíferos y algunos hongos unicelulares, tales como las levaduras, producen pequeñas células globulares o elipsoides que sólo son visibles bajo el microscopio y que permiten su identificación (Hanson, 2008).

1.7 Hongos fitopatógenos

Los fitopatógenos fungosos han tenido un impacto importante en la historia, se estima que aproximadamente el 70% de todas las enfermedades de los cultivos principales son causadas por hongos (Hanson, 2008). El daño que ocasionan no sólo se refiere a las pérdidas desde el punto de vista económico, sino también a las pérdidas biológicas, es decir, a la alteración que existe en el crecimiento y desarrollo de las plantas hospedantes atacadas por estos organismos, así como también a la afectación de los diferentes órganos que se destinan para el consumo (como flores y frutos) e incluso en las pérdidas poscosecha en frutas y granos almacenados (Rodríguez, 2001).

Uno de los ejemplos más notorios es la hambruna que se vivió en Bengala en 1943, de la que se estima ocasionó la muerte de aproximadamente 2 millones de personas, debido a las pérdidas en el cultivo de arroz, que fue afectado por el patógeno *Helminthosporium oryzae* (ahora conocido también como *Bipolaris oryzae* o *Cochliobolus miyabeanus*), (Hanson, 2008). Otro ejemplo, son los hongos del género *Fusarium* que causan daños graves a numerosas especies de plantas en todo el mundo (Li, *et al.*, 2008; Youssef *et al.*, 2007; Mirete *et al.*, 2004; Weiland y Sundsbak, 2000), como lo son el maíz, el trigo y la cebada, a los que infecta y genera grandes pérdidas (Nganje *et al.*, 2004; Windels, 2000). En los últimos años, el cultivo de maíz ha sido motivo de especial preocupación debido a la infección por *Fusarium* spp. que produce metabolitos tóxicos (micotoxinas) que presentan una gran amenaza para la salud humana o animal. Además, de lo anterior, dichas toxinas afectan la calidad de los granos utilizados en la industria alimentaria (McMullen *et al.*, 1997).

1.8 Identificación y caracterización morfológica

Los medios más comunes para la identificación de hongos se basan en las características de sus esporas, de sus cuerpos fructíferos (estructuras que portan a las esporas) y hasta cierto grado, en las características de su soma (Azevedo *et al.*, 2010). El uso de las claves taxonómicas y la comparación de las características observadas son de vital importancia para lograr una correcta identificación de organismos fúngicos (Azevedo, *et al.*, 2010). Para los fines de identificación microscópica, se toman las estructuras reproductivas de los hongos, se colocan en lactofenol y se observan con el microscopio. La caracterización macroscópica de las colonias se basa en la observación del color, tasa de crecimiento, borde, textura y difusión del hongo en el medio, así como la manera en que se disponen las esporas sobre los esporóforos o cuerpos fructíferos (Sidrim y Moreira, 1999). Esas estructuras reproductoras, son características suficientes para sugerir (con una cierta experiencia en taxonomía de hongos), la clase, orden, familia y género al cual pertenece un determinado hongo y esto se logra mediante la consulta de claves morfométricas que se han publicado para la identificación de las especies de hongos. Una vez que se ha determinado el género al cual pertenece el microorganismo, deben consultarse las descripciones específicas de la especie, en monografías de los diferentes géneros fungos en publicaciones específicas de revistas de investigación (Agrios, 2005).

1.9 Identificación molecular

La taxonomía en el reino Fungi hasta la década de 1980, se basaba casi exclusivamente en los caracteres morfológicos para delimitar las especies o los diferentes niveles taxonómicos (Webster y Weber, 2007). Sin embargo, dichos caracteres presentan una serie de problemas asociados, como es la dificultad de diferenciar hongos estrechamente relacionados, la laboriosidad de sus métodos de estudio y, en algunos casos, incluso la insuficiente resolución para la delimitación de los taxones (Guarro *et al.*, 1999). Es por ello que actualmente los taxónomos han recurrido a la biología molecular como una herramienta de apoyo para permitirles solucionar algunos de los problemas mencionados.

En las últimas décadas se ha dado especial atención a la aplicación de técnicas moleculares para la detección e identificación de fitopatógenos (Pecina-Quintero *et al.*,

2001). En particular la tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ha revolucionado la biología molecular y el diagnóstico molecular de los hongos (Hanson, 2008). Las técnicas basadas en la PCR son un poderoso método de diagnóstico que distingue taxones a nivel de especie en hongos y utilizando algunos marcadores moleculares hasta nivel intraespecífico (Edwards *et al.*, 2002). Además, de que reducen los tiempos de detección, son precisos y sensibles. Los ensayos de PCR para este fin pueden utilizar iniciadores específicos que se generan a partir de secuencias de origen diverso (Turner *et al.*, 1998), o de regiones específicas del genoma fúngico (Moukhamedov *et al.*, 1994). Algunas de las técnicas moleculares utilizadas para la identificación de hongos son las siguientes:

El análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) basado en la digestión con enzimas de restricción del ADN genómico, es una técnica que se ha utilizado para clasificar cepas fúngicas dentro de una determinada especie (Viaud *et al.*, 2000), para ver conexiones anamorfo–teleomorfo (Gené *et al.*, 1996), así como para establecer variabilidad genética entre cepas de una misma especie (Quirk y Kupinski, 2002; Blanz *et al.*, 2000; Jackson *et al.*, 1999).

ADN polimórfico amplificado al azar (RAPDs). Esta técnica se basa en la amplificación por PCR de regiones del genoma al azar, para ello se utilizan uno o varios iniciadores con una longitud de 10 nucleótidos que hibridan con regiones inespecíficas del genoma (Welsh y McClland, 1990). Ha sido básicamente utilizada para clasificar cepas de una misma especie (Boldo *et al.*, 2003, Kano *et al.*, 1998;), aunque su principal problema es la reproducibilidad (Taylor *et al.*, 1999).

Otra de las técnicas utilizadas para la identificación de cepas fúngicas (Schmidt *et al.*, 2004; Treadway *et al.*, 1999; Majer *et al.*, 1996) y clasificación de las cepas (Soll, 2000) es la de los Polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLPs) (Gräser *et al.*, 1999). Esta técnica se basa en la unión de adaptadores al ADN genómico previamente digerido, seguido de una PCR con iniciadores específicos para estos adaptadores que incluyen un isótopo radiactivo o pueden estar marcados con quimioluminiscencia.

Las secuencias simples repetidas (SSR) o microsatélites se han utilizado como marcadores moleculares en numerosos experimentos para determinar huellas genéticas, esto es debido a su abundancia y al alto nivel de polimorfismo entre los distintos individuos. Los SSR son unidades repetidas en tándem de 1 a 6 pares de bases que se encuentran abundantes en los genomas procariotas y eucariotas (Karaoglu *et al.*, 2004). Esta técnica se utiliza para caracterizar cepas de hongos y levaduras cuyo genoma se desconoce (Meyer *et al.*, 2003; Meyer *et al.*, 2001).

En *sensu lato*, la huella genética (*DNA fingerprinting*) es el proceso por el cual un individuo puede ser identificado de manera única, mediante pruebas que revelan polimorfismos múltiples en el ADN. Por ello, la huella genética de un individuo de una especie dada, puede obtenerse mediante la aplicación de diferentes técnicas moleculares tales como: microsatélites (SSR), AFLPs, RFLPs, etc. (Van der Vossen *et al.*, 2003; Applied Molecular Genetics Laboratory, 1996).

ADN ribosómico. El ADNr es la región del genoma fúngico más utilizada para estudios filogenéticos (Bruns *et al.*, 1992; Hillis y Dixon, 1991). Esta región ha sido seleccionada principalmente por el hecho de que los genes del ADNr son multicopia y están organizados en tandem de hasta 200 copias por núcleo (Butler y Metzenberg, 1989). Las regiones del ADNr más comúnmente estudiadas son los tres genes codificantes (18S, 5.8S, y 28S) y los dos espaciadores internos (ITS1 y ITS2) También se encuentran asociadas a este complejo de genes la región espaciadora intergénica IGS con 2 regiones no codificadoras (ETS1 y ETS2) (Iwen *et al.*, 2002). Todas estas regiones del ADNr permiten realizar estudios filogenéticos a diferentes niveles taxonómicos (Bruns *et al.*, 1991).

La región del gen 18S tiene alrededor de 1800 pb de tamaño, posee tanto dominios variables como conservados. Los polimorfismos de esta región han permitido establecer relaciones taxonómicas principalmente de grandes grupos entre eucariotas, pero también han permitido, en algunos casos, la distinción entre géneros y especies (Einsele *et al.*, 1997). Sin embargo, en el caso de los hongos esta región presenta una elevada similitud entre las especies, y puede ayudarnos a distinguir géneros pero no especies (Iwen *et al.*, 2002).

La región del gen 5.8S, por otro lado, únicamente posee unos 160 pb y se encuentra altamente conservada entre los principales grupos de hongos. Debido a su pequeño tamaño y su conservada naturaleza, este gen no es apropiado para clarificar estudios filogenéticos. No obstante, su secuencia conservada ha sido utilizada como punto de unión de iniciadores universales para amplificar las regiones espaciadoras flanqueantes, ITS1 y ITS2, que si son de gran utilidad para establecer relaciones filogenéticas (White *et al.*, 1990).

Las regiones ITS1 e ITS2 que flanquean el gen 5.8S muestran una gran variabilidad entre los eucariotas. La longitud de las secuencias de cada una de estas dos regiones varía desde más de 1000 pb en las células humanas hasta menos de 300 pb en algunas levaduras (Joseph *et al.*, 1999; González *et al.*, 1990). Estas regiones han sido utilizadas en numeroso estudios como diana para la identificación de especies fúngicas (Iwen *et al.*, 2002).

El gen 28S es el que posee un mayor número de pares de bases (alrededor de 3400) y presenta tanto regiones conservadas como variables. Son estas regiones variables, principalmente los denominados Dominios 1 y 2 (D1 y D2), los que han permitido delimitar especies (Iwen *et al.*, 2002) e incluso categorías taxonómicas superiores (Sampaio *et al.*, 2002).

Entre otras técnicas utilizadas, se encuentran los AP-PCR y los PCR-RFLPs. Los AP-PCR utilizan iniciadores de 15 nucleótidos que amplifican el ADN de manera aleatoria, tienen la ventaja de que para su utilización no se necesita tener conocimiento previo de la secuencia del genoma o del ADN de interés y han sido utilizados para diferenciar entre poblaciones de varias especies de *Colletotrichum* (Johnston y Jones, 1997). La técnica PCR-RFLPs ha sido utilizada en la diferenciación de especies de hongos y combina la amplificación de una región objetivo con la posterior digestión enzimática (Carter *et al.*, 2000). Los patrones producidos por las enzimas de restricción se obtienen de una sola región genómica como por ejemplo el ADN ribosómico, el cual debe ser previamente amplificado con iniciadores específicos y dependiendo del tamaño o nivel de la variabilidad de la región amplificada se puede diferenciar cepas a nivel interespecífico o intraespecífico. En el caso de hongos filamentosos, se ha empleado para distinguir

especies del género *Fusarium* (Mirete *et al.*, 2003) y también para diferenciar a dos especies de *Colletotrichum* en papaya (*C. capsici* y *C. gloeosporioides*) (Tapia-Tussell *et al.*, 2008).

1.10 Variabilidad genética en hongos

Los organismos vivos que se desarrollan en condiciones naturales, están bajo una continua interacción de adaptación con los factores en los que crecen. Esta interacción adaptativa, resulta en la acumulación de la información genética que cada especie va guardando entre los miembros de su población y que se va transmitiendo en las subsiguientes generaciones a través del tiempo, de tal manera, que la población de individuos de una especie comparte características comunes y también variantes individuales. A la suma de todos los individuos con sus respectivas variantes, es lo que se conoce como variabilidad genética, y es la que permite a las especies adaptarse a los cambios que pueden presentar en su entorno (Hidalgo 2003).

Por lo tanto, la generación de nuevas variantes genéticas, se convierte en una ventaja para los organismos, porque garantiza la sobrevivencia de su prole, ante cualquier cambio eventual (Rivera 2007), de tal manera que una población con un alto grado de variabilidad genética, tiene mayor capacidad de respuesta a las variaciones a las cuales se expone y por lo tanto más probabilidades de adaptarse y sobrevivir.

En el caso de los hongos fitopatógenos, estos cambios no solamente se refieren al ambiente físico natural, sino a los cambios en las características genéticas de sus hospederos (en donde los parásitos obligados necesitan adaptarse con rapidez para evitar su extinción) y a los elementos extraños introducidos por las prácticas agrícolas, como los fungicidas (Arauz 1998).

De acuerdo a Agrios 2005, los mecanismos por medio de los cuales se genera variabilidad genética en los hongos son: recombinación sexual y mutación.

La recombinación sexual se origina cuando dos gametos haploides (n) se unen para formar el cigoto ($2n$) y en la meiosis se producen entrecruzamientos genéticos, como resultado de los cuales pueden aparecer variantes para diversos caracteres, como los

asociados a la patogenicidad. De este modo, la progenie puede adquirir características nuevas que le permitan evadir la resistencia del hospedero o el efecto de un fungicida específico sobre su metabolismo.

La mutación consiste en cambios abruptos y espontáneos en la secuencia de nucleótidos del ADN de los hongos, los cuales son transmitidos por herencia a la progenie. Estas mutaciones pueden deberse a la sustitución de una base por otra, o por adición o pérdida (delección) de uno o muchos pares de bases.

La comprensión de la variación y la diversidad en las poblaciones de patógenos fungosos y los mecanismos que influyen en los cambios genotípicos en las mismas, es un paso esencial en las estrategias de manejo de las enfermedades. La información sobre la variación del hongo es también útil para la identificación y caracterización del germoplasma resistente del hospedero. Para la evaluación de la resistencia se necesita utilizar diversas cepas de la población del patógeno obtenidas de distintos ecosistemas del cultivo de interés que representen la diversidad y variación en la agresividad de la población del patógeno fungoso. Este conocimiento deviene en un componente integral del mejoramiento para la resistencia a enfermedades fungosas y en el diseño de opciones de resistencia acoplada con prácticas de manejo adecuadas (Burgos et al., 2013; Ebadi et al., 2013; Kempken 2002).

JUSTIFICACIÓN

Aunque *Jatropha curcas* se considera una especie resistente al estrés biótico, la experiencia de los productores en Yucatán difiere de esto, debido a que han enfrentado pérdidas considerables en la productividad debidas a plagas y enfermedades, específicamente causadas por hongos.

En México existe poca información sobre este tema y debido a que en Yucatán se tienen grandes extensiones de monocultivo de *Jatropha*, es preciso estudiar a los principales patógenos fungosos que afectan a estos cultivares, para recomendar estrategias de manejo fitosanitario que permitan mantener su sanidad.

HIPÓTESIS

Las enfermedades fungosas de *Jatropha curcas* en Yucatán son producidas por especies con alto nivel de variabilidad genética.

OBJETIVOS

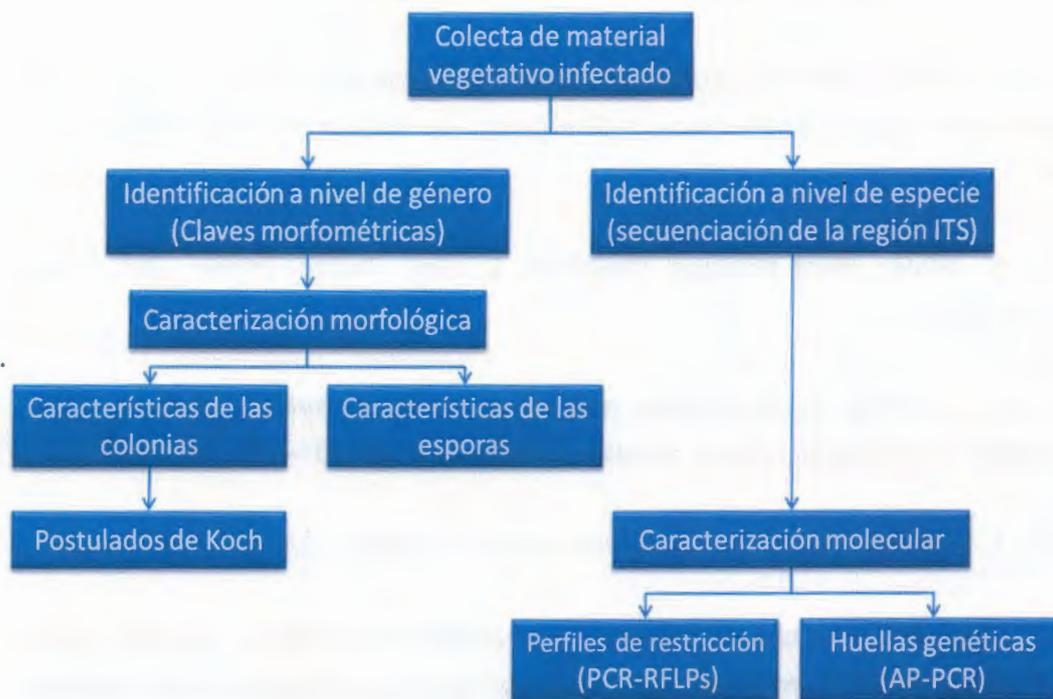
Objetivo general

Identificar y caracterizar morfológica y molecularmente los hongos patógenos que afectan el cultivo de *Jatropha curcas* en la región.

Objetivos específicos

- Identificar a nivel de género los aislados fungosos mediante claves morfométricas y caracterizarlos morfológicamente.
- Verificar la patogenicidad de los aislados.
- Identificar y caracterizar molecularmente los aislados encontrados.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



REFERENCIAS

- AEA. (Alianza en Energía y Ambiente con Centroamérica) (2006). *Jatropha curcas* L su expansión agrícola para la producción de aceites vegetales con fines de comercialización energética. Octagón S.A. Guatemala, 22 pp.
- Agarwal, A. K. (2007). Biofuels (alcohols and biodiesel) Applications as Fuels for Internal Combustion Engines en Progress In: Energy and Combustion Science. 33 (3): 233-271.
- Agrios, N. G. (2005). Plant pathology. Dreilbebis, D. (Ed). Quinta Edición. San Diego California. 993 pp.
- Akintayo, E. T. (2004). Characteristics and composition of *Parkia biglobbosa* and *Jatropha curcas* oils and cakes. *Bioresour Technology*, 92: 307–310
- Alfonso, B. J. A. (2008). Manual para el cultivo del piñón (*Jatropha curcas*) en Honduras.
- Ancona, A. Destacan potencial de Yucatán en biocombustibles Mérida, Yucatán; 15 de septiembre de 2011 [en línea] <http://www.reporterohoy.mx/wp/destacan-potencial-de-yucatan-en-biocombustibles.html> Consultado el 30 de Octubre de 2012.
- Andrade, C. V. (2009). Presente y futuro de las oleaginosas en el ecuador En: Cultivos energéticos alternativos. Grupo Seritex 59-74.
- Applied Molecular Genetics Laboratory, CIMMYT, Int. (1996). Molecular marker applications to plant breeding. Workshop, CIMMYT Headquarters, El Batán, México, 6-7.
- Arauz, C. L. F. (1998). Fitopatología: un enfoque agro ecológico. Primera edición. Editorial de la universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica, 467 p.

- Aswatha, N. D. S., Shankarappa, K. S., Govindappa, M. R., Prameela, H. A., Gururaj, R. M. R., y Rangaswamy, K. T. (2006). Natural occurrence of *Jatropha mosaic virus* disease in India. Scientific correspondence. *Current Science* 91(5): 585.
- Azevedo, E., Figueira, D., Caeiro, M. F., y Barata, M. (2010). Biodiversity of filamentous fungi on soils and sands. In: Progress en mycology. Rai, M., Kovic, G. (Ed) Scientific Publishers (India) New Pali Road, 245-270.
- Banjo, A. D., Lawal, O. A. y Aina, S. A. (2006). The entomofauna of two medicinal Euphorbiaceae in southwestern Nigeria. *Journal of Applied Sciences Research*, 2, 858–863.
- Benge, M. (2006). Assessment of the potential of *Jatropha curcas*, (biodiesel tree) for energy production and other uses in developing countries. Madison, W. In: USDA Forest Service's Publications. p.14.
- Bhattacharya, A., Datta, K., y Datta, S. K. (2005). Floral. Biology, floral resource constraints and pollination limitation in *Jatropha curcas* L. Pakistan. *Journal of Biological Sciences*, 8: 456-460.
- Blackwell, M. (2011). The fungi: 1, 2, 3...5.1 million species? *American Journal of Botany* 98(3):426–438.
- Blackwell, M. R., Vigalys, R., James, Y. T., y Taylor, J. W. (2009). Fungi. Eumycota: Mushrooms, sac fungi, yeast, molds, rusts, smuts, etc. (Version 10). <http://tolweb.org/Fungi/2377/2009.04.10> (Consulta Mayo 13, 2012).
- Blanz, P., Buzina, W., Ginter, G., y Gräser, Y. (2000). Molecular biological methods and their consequences in taxonomy and diagnosis of dermatophytes. *Mycoses* 43:suppl. 1:11-19.
- Boldo, X. M., Villa-Tanaca, L., Zúñiga, G., Hernández-Rodríguez, C. (2003). Genetic diversity among clinical isolates of *Candida glabrata* analyzed by randomly amplified

- polymorphic DNA and Multilocus enzyme electrophoresis Analyses. *Journal of Clinical Microbiological*, 41: 4799-4804.
- Bruns, T. D., Vilgalys, R., Barns, S. M., González, D., Hibbett, D. S., Lane, D. J., Simon, L., Stickel, S., Szaro, T. M., Weisburg, W. G., y Sogin, M. L. (1992). Evolutionary relationships within the Fungi: analyses of nuclear small subunit rRNA sequences. *Molecular Phylogenetics Evolution*, 1:231-241.
- Bruns, T. D., White, T. J., Taylor, J. W. (1991). Fungal Molecular Systematics. *Annual Reviews Ec Systems*, 22:525-564.
- Burgos, M. R. G. Katimbang, M. L. B., De la Paz, M. A. G., Beligan, G. A., Goodwin, P. H., Ona, I. P., Mauleon, R. P., Ardales, E. Y., Vera C. C. M. (2013). Genotypic variability and aggressiveness of *Bipolaris oryzae* in the Philippines. *European Journal of Plant Pathology*, 137: 415–429.
- Butler, D.K., y Metzenberg, R. L. (1989). Premeiotic change of nucleolus organizer site in *Neurospora*. *Genetics* 122:783-791.
- Carter, J. P., Rezanoor, H. N., Desjardins, A. E. and Nicholson, P. (2000). Variation in *Fusarium graminearum* isolates from Nepal associated with their host of origin. *Plant Pathology*, 49: 452-460.
- Chang-Wei, L., Kun, L., You, C., y Yongyu, S. (2007). Floral display and breeding system of *Jatropha curcas* L. *For. Studies China*, 9(2): 114–119
- Chen, Y. X., Mao, Z. Q., Wu, Z. B., Zhu, H. P., y Tang, Z. Y. (2006). Comprehensive exploitation and utilization of *Jatropha* oil plants. *China Oils Fats*, 31, 63-65.
- Cifuentes-Jara, M. y Fall, A. (2009). *Jatropha curcas* como biocombustible: estado actual del cultivo en Mesoamérica. *Recursos Naturales y Ambiente*, 56-57, 166-171.

- Cronquist, A. (1981). *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*. The New York Botanical Garden. Columbia University Press. New York, USA, 1262 pp.
- De la Vega L. J. A. 2008. *Jatropha curcas* L. Consultor Independiente, México. Agroproyectos y Agro-energía. <http://3wmexico.com/images/JatrophaResumen.pdf>.
- De Siqueira, F. D. A. y Gabriel, D. (2008). Aspectos fitossanitários na cultura do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) para produção de biodiesel. *Biológico*, São Paulo, 70 (2): 63-64
- Desjardin, D. E., Perry, B. A., Lodge, D. J., Stevani, C. V., y Nagasawa, E. (2010). Luminescent mycena: New and noteworthy species. *Mycologia* 102(2): 459–477.
- Dorado, M. P. (2008). Raw Materials to Produce Low-Cost Biodiesel In: *Biofuels Refining and Performance*. Nag, Ahindra (Ed). *McGraw-Hill*. 348 pp.
- Dunlap, J. C., Borkovich, K. A., Henn, M. R., Turner, G. E., Sachs, M. S., Glass, N. L., McCluskey, K., Plamann, M., Galagan, J. E., Birren, B. W., Weiss, R. L., Townsend, J. P., Loros, J. J., Nelson, M. A., Lambreghts, R., Colot, H. V., Park, G., Collopy, y. P., Ringelberg, C., Crew, C., Litvinkova, L., DeCaprio, D., Hood, H. M., Curilla, S., Shi, M., Crawford, M., Koerhsen, M., Montgomery, P., Larson, L., Pearson, M., Kasuga, T., Tian, C., Basturkmen, M., Altamirano, L., y Xu, J. (2007). Dissect an Organism: Overview of the Neurospora Functional Genomics Project In: *fungus genetics*. Dunlap, J. C., Friedmann, T., Heyningen, V. V. (edit). Academic Press, San Diego, California, USA. 49.
- Ebadi, M. Riahi, H. y Zare, R. (2013). Genetic diversity of *Fusarium semitectum* isolates from rice, using RAPD and REP-PCR markers. *Mycologia Iranica*, 1(1): 14-20.
- Edwards, S. O., Callaghan, J., y Dobson, A. D. W. (2002). PCR-based detection and quantification of mycotoxigenic fungi. *Mycology Research*, 106, 1005-1025.

- Einsele, H., Hebart, H., Roller, G., Löffler, J., Rothenhofer, I., Muller, C. A., Bowden, R. A., Van Burik, J., Engelhard, D., Kanz, L., y Schumacher, U. (1997). Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *Journal of Clinical Microbiology*, 35:1353.
- Espinoza-Verduzco, M. de los A., Santos-Cervantes, M. E., Fernández-Herrera, E., Espinoza-Mancillas, M. G., Chávez-Medina, J. A., Bermúdez-Álvarez, E. M. Martínez-Ayala, A. L., Méndez-Lozano, J., y Leyva-López, N. E. (2012): First report of *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler causing inflorescence blight in *Jatropha curcas* in Sinaloa, Mexico, *Canadian Journal of Plant Pathology*.
- Freire, F. das C. O. y Parente, G B. (2006). As doenças das *Jatrophas* (*Jatropha curcas* L. e *Jatropha podagrica* Hook.) no Estado do Ceará. Comunicado técnico, 120. Embrapa Agroindústria Tropical.
- Fu, G., Huang, S. L., Wei, J. G., Yuan, G. Q., Ren, J. G., Yan, W. H., y Cen, Z. L. (2007). First record of *Jatropha podagrica* gummosis caused by *Botryodiplodia theobromae* in China. *Australasian Plant Disease Notes* 2: 75–76.
- Garcete, L., Orrego, A., y Rodríguez, H. (2009). Primeros reportes de patógenos de *Jatropha curcas* en Paraguay en cultivos implantados. Congresso Brasileiro de Pesquisas de Pinhão Manso.
- Gené, J., Guillamón, J. M., Guarro, J., Pujol, I., y Ulfing, K. (1996). *Hormographiella aspergillata* anamorph of *Coprinus cinereus*, a human opportunistic fungus: molecular characterization and antifungal susceptibility. Anton. Leeuw. Int. J. G. 70:49-57.
- GEXSI (The Global Exchange for Social Investment) (2008). Global market study on *Jatropha*. Final Report. London, Reino Unido, 187 p.
- González, A. A., García, M. K. P., Hernández, G. M. A., Teniente, O. R., Solís, B. J. L., y Zamarripa, C. A. (2011). Guía para cultivar piñón mexicano (*Jatropha curcas* L.) en

- Jalisco. Folleto técnico Núm. 6 INIFAB-CIRPAC Campo Experimental centro Altos de Jalisco. Tepatitlán de Morelos, Jalisco, México.
- González, I. L., Chambers, C., Gorski, J. L., Stambolian, D., Schmickel, R. D., y Sylvester, J. E. (1990). Sequence and structure correlation of human ribosomal transcribed spacers. *Journal of Molecular Biology*, 212: 27-35.
- Gräser, Y., Kühnisch, J., y Presber, W. (1999). Molecular markers reveal exclusively clonal reproduction in *Trichophyton rubrum*. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 3713-3717.
- Guarro, J., Gené, J., y Stchigel, A. M. (1999). Developments in fungal taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews*, 12:454-500.
- Hanson, J. R. (2008). *The Chemistry of Fungi*. The Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Cambridge, 1-17
- Heller, J. (1996). Physic nut (*Jatropha curcas* L.). International Plant Genetic Resource Institute. Rome. 66 pp.
- Hidalgo, R. (2003). Variabilidad genética y caracterización de especies vegetales. En: Análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Fitogenéticos. Boletín Técnico No. 8, Instituto internacional de recursos Fitogenéticos (IPGRI), Cali, Colombia. 89 p.
- Hillis, D. M., y Dixon, M. T. (1991). Ribosomal DNA molecular evolution and phylogenetic inference. *Quarterly. Review Biology*. 66: 410-453.
- Hinojosa, F. I. D. y Skutsch, M. (2011). Impacto de establecer *Jatropha curcas* para producir biodiesel, en tres comunidades de Michoacán, México, abordado a partir de diferentes escalas. *Revista Geográfica de América*, Número Especial EGAL, Costa Rica, 1-15

Capítulo I

- Iwen, P. C., Hinrichs, S. H. y Rupp, M. E. (2002). Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. *Medical Mycology*, 40: 87-109.
- Jackson, J. C., Barton, R.C., y Evans, E. G. V. (1999). Species identification and strain differentiation of dermatophyte fungi by Analysis of Ribosomal-DNA Intergenic Spacer Regions. *Journal Clinical Microbiological*, 37:931-936.
- Jin-Hyeuk, K., Choi, O., Kim, J. y Kwak, Y. (2012) First report of Anthracnose disease on *Jatropha curcas* caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in Korea. *Journal Phytopathology*, 160(5): 255–257.
- Johnston, P.R., y Jones D. (1997). Relationship among *Colletotrichum* isolates from fruit rots assessed using rDNA sequences. *Mycologia*, 89: 420-430.
- Joseph N, Krauskopf E, Vera MII, Michot B. 1999. Ribosomal internal transcribed spacer 2 (ITS2) exhibits a common core of secondary structure in vertebrates and yeast. *Nucleic Acids Research*, 27: 4533-4540.
- Kano, R., Nakamura, Y., Watanabe, S., Takahashi, H., Tsujimoto, H., y Hasegawa, A. (1998). Differentiation of *Microsporum* species by random amplification of polymorphic DNA (RAPD) and Southern hybridization analyses. *Mycoses* 41: 229-233.
- Karaoglu, H., Ying, L. C. M. y Meyer, W. (2004). Survey of Simple Sequence Repeats in Completed Fungal Genomes. *Molecular Biology and Evolution*, 22 (3).
- Kaushik, N., Roy, S., y Biswas, G. C. (2006). Screening of Indian germplasm of *Jatropha curcas* for selection of high oil yielding plants. *Indian Journal of Agroforestry*, 8, 54–57.
- Kaushik, N., Sharma, S., y Kaushik, J. C. (2001). *Fusarium moniliforme* causing root rot of *Jatropha*. *Indian Phytopathology*, 54(2): 275

- Kempken, F. (2002). Agricultural Applications. In: The Mycota XI, A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research. Esser, K. y Bennet, J. W. (Eds). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 381 p.
- Kumar, R., Srivastava, S., Sinha, A., Sarma, B.K. y Kamil, D. (2012). First report of *Alternaria alternata* causing fruit rot disease of *Jatropha curcas* from India. Short communication. *Journal of Mycology and Plant Pathology*, 42 (2).
- Kuo. Grupo KUO y REPSOL forman empresa conjunta para la producción de bioenergía. Madrid, España a 28 de octubre de 2010 [en línea] <http://www.kuo.com.mx/contenido.php?contenido=145> Consultado el 17 de mayo de 2012.
- Latha, P., Prakasam, V., Kamalakannan, A., Gopalakrishnan, C., Raguchander, T., Paramathma, M., y Samiyappan, R. (2009). First report of *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl causing root and collar rot disease of physic nut (*Jatropha curcas* L.) in India. *Australasian Plant Disease Notes*, 4: 19–21.
- Li, S., Hartman, G. L., Domier, L. L., y Boykin, D. (2008) Quantification of *Fusarium solani* f. sp. *Glycines* isolates in soybean roots by colony-forming unit assays and real time quantitative PCR. *Theoretical Applied Genetics*, 117:343–352.
- Lutzoni, F., Kauff, F., Cox, C. J., McLaughlin, D., Celio, G., Dentinger, B., Padamsee, M., Hibbett, D., James, T. Y., Baloch, E., Grube, M., Reeb, V., Hofstetter, V., Schoch, C., Arnold, A. E., Miadlikowska, J., Spatafora, J., Johnson, D., Hambleton, S., Crockett, M., Shoemaker, R., Sung, G. H., Lucking, R., Lumbsch, T., O'Donnell, K., Binder, M., Diederich, P., Ertz, D., Gueidan, C., Hansen, K., Harris, R. C., Hosaka, K., Lim, Y. W., Matheny, B., Nishida, H., Pfister, D., Rogers, J., Rossman, A., Schmitt, I., Sipman, H., Stone, J., Sugiyama, J., Yahr, R., y Vilgalys, R. (2004). Assembling the fungal tree of life: Progress, classification, and evolution of subcellular traits. *American Journal of Botany* 91(10):1446–1480.

- Majer, D., Mithen, R., Lewis, B. G., Vos, P., y Oliver, R. P. (1996). The use of AFLP fingerprinting for the detection of genetic variation in fungi. *Mycology Research*, 100: 1107-1111.
- Makkar, H. P. S., Becker, K., Schmook, B. (1998). Edible provenances of *Jatropha curcas* from Quintana Roo state of Mexico and effect of roasting on antinutrient and toxic factors in seeds. *Plant Food for Human Nutrition*. 52, 31-36.
- Makkar, H. P. S., y Becker, K. (2009). *Jatropha curcas*, a promising crop for the generation of biodiesel and value-added coproducts. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111: 773–787.
- Martínez, H. J., Martínez A. A. L., Makkar, H., Francis, G., y Becker, K. (2010). Agroclimatic Conditions, Chemical and Nutritional Characterization of Different Provenances of *Jatropha Curcas* L. from Mexico. *European Journal of Scientific Research*, 39(3): 396-407.
- McMullen, M. M., Jones, R., y Gallenberg, D. (1997). Scab of wheat and barley: a re-emerging disease of devastating impact. *Plant Disease*, 81(12):1340–1348.
- Meyer, W., Castaneda, A., Jackson, S., Huynh, M., y Castaneda, E. (2003). Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* Isolates. *Emerging Infect Diseases*. 9:189–195.
- Meyer, W., Maszewska, K., y Sorrell, T. C. (2001). PCR-fingerprinting a convenient molecular toll to distinguish between *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *Medical.Mycology*. 39: 185–193.
- Mirete, S., Patiño, B., Vázquez, C., Jiménez, M., Hinojo, M. J., Soldevilla, C. González-y Jaén, J. M. T. (2003). Fumonisin production by *Gibberella fujikuroi* strains from Pinus species. *International Journal of Food Microbiology*, 89: 213-221.

- Mirete, S., Vazquez, C., Moulé, G., Jurado, M., González-Jaén, M. T. (2004) Differentiation of *Fusarium verticillioides* from banana fruits by IGS and EF-1a sequence analysis. *European Journal of Plant Pathology*, 110:525–523.
- Moukhamedov, R., Hu, X., Nazar, R. y Robb, J. (1994). Use of polymerase chain reaction-amplified ribosomal intergenic sequences for the diagnosis of *Verticillium tricorpus*. *Phytopathology*, 84, 256-259.
- Nganje, W. A., Bangsund, D. A., Leistriz, F. L., Wilson, W. W., y Tiapo, N. M. (2004) Regional economic impacts of *Fusarium* head blight in wheat and barley. *Review of Agricultural Economics*, 26(3): 332–337.
- Nielsen, F. (2009). Plagas y enfermedades In: Manual de *Jatropha*. *Fuels from Agriculture in Communal Technology*. 230 p.
- Núñez-Colín, C. A., y Goytia-Jiménez, M. A. (2009). Distribution and agroclimatic characterization of potential cultivation regions of *physic nut* in México. *Pesquisa agropecuária Brasileira*, 44(9): 1078-1085.
- Orrego, A. L. (2008). Enfermedades en vivero del Piñón Manso (*Jatropha curcas*). En: Orrego Fuente, A: *Jatropha curcas* o piñón manso, una alternativa al biodiesel. San Lorenzo, PY: FCA, UNA. 62-71
- Ovando-Medina, I., Sánchez-Gutiérrez, A., Adriano-Anaya, L., Espinosa-García, F., Núñez-Farfán, J., y Salvador-Figueroa, M. (2011). Genetic Diversity in *Jatropha curcas* Populations in the State of Chiapas, Mexico. *Diversity*, 3, 641-659.
- Pabón, G. G. (2009). Estudio de las características botánicas y etnobotánicas de *Jatropha* (*Jatropha curcas* L.) En: Cultivos energéticos alternativos. Grupo Seritex. 25-38 pp.
- Pecina-Quintero, V., Martínez-de la vega, O., Alvarado-Balleza, M. de J., Vandermark, G. J. y Williams-alanís, H. (2001) Comparación de dos sistemas de marcadores

moleculares en el análisis de las relaciones genéticas de *macrohomina phaseolina* (tassi) Goid. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 19:128-139.

Pereira, O. L., Dutra, D. C., y Dias, L. A. S. (2009). *Lasiodiplodia theobromae* is the causal agent of a damaging root and collar rot disease on the biofuel plant *Jatropha curcas* in Brazil. *Australasian Plant Disease Notes*, 4: 120–123.

Quirk, J. T. y Kupinsky, J. M. (2002). Interspecific mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphisms in *Aspergillus* section Flavi. *Mycologia*, 94:1078-1086.

Raj, S. K., Snehi, S. K., Kumar, S., Khan, M. S. y Pathre, U. (2008). First molecular identification of a begomovirus in India that is closely related to *Cassava mosaic virus* and causes mosaic and stunting of *Jatropha curcas* L. *Australasian Plant Disease Notes*, 2008, 3: 69-72.

Raju A. J. S., y Ezradanam V. (2002). Pollination ecology and fruiting behavior in a monoecious species *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). *Current Science India*, 83(11): 1395–1398.

Randelli, F. (2008). An Integrated Analysis of Production Costs and Net Energy Balance of Biofuels en Regional Environmental Change. 9(3): 221-22.

Reddy, M. P. y Pamidimarri D. V. N. S. (2010). Biology and Biotechnological Advances in *Jatropha curcas* – a Biodiesel Plant In: Deserts plants. K.G. Ramawat (Ed). Berlin Heidelberg, 1, 57-71.

Regupathy, A., y Ayyasamy, R. (2006). Need for generating baseline data for monitoring insecticide resistance in leaf Webber cum fruit borer, *Pempelia morosalis* (Saalm Uller), the key pest of biofuel crop, *Jatropha curcas*. *Resistant Pest Management Newsletter*, 16, 1–5.

- Rivera, C. G. (2007). Conceptos introductorios a la fitopatología. Reimpresión de la primera edición. Editorial Universidad Estatal a Distancia, San José, Costa Rica, 346 p.
- Rodríguez, G. M. P. (2001). Biodiversidad de los hongos fitopatógenos del suelo de México. *Acta Zoológica Mexicana*, 1, 53-78.
- Sampaio, J.P., Weib, M., Gadanho, M., y Bauer, R. (2002). New taxa in the Tremellales: *Bulleribasidium oberjochense* gen. et sp. nov., *Papiliotrema bandonii* gen. et sp. nov. and *Fibulobasidium murrhardtense* sp. Nov. *Mycologia*. 94: 873–887.
- Saturnino, H., Pacheco, D., kakida, J., Tominaga, N., y Gonçalves, N. (2005). Produção de oleaginosas para biodiesel. Informe Agropecuario (BR). 26(229): 44-78.
- Schmidt, H., Niessen, L., y Vogel, R.F. (2004). AFLP analysis of *Fusarium* species in the section *Sporotrichiella*-evidence for *Fusarium langsethiae* as a new species. *International Journal. Food Microbiology*, 95: 297-304.
- Shanker, C., y Dhyani, S. K. (2006). Insect pests of *Jatropha curcas* L. and the potential for their management. *Current Science*, 91, 162–163.
- Sidrim, I. C., y Moreira, I. B. (1999). Diagnostico laboratorial de fungos filamentosos e dimorficos: Aspectos gerais In: Fundamentos clinicos e laboratoriais da Micologia Medica Sidrim, I. C., Moreira, I. B., Eds. Guanabara Koogan., Rio de Janeiro, 70-75.
- Soll, D. R. (2000). The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. *Clinical Microbiology Reviews*. 13: 332-370.
- Tapia-Tussell, R., Quijano-Ramayo, A., Cortes-Velazquez, A., Lappe, P., Larqué-Saavedra, A., y Perez-Brito, D. (2008). PCR-Based Detection and Characterization of the Fungal Pathogens *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum capsici* Causing Anthracnose in Papaya (*Carica papaya* L.) in the Yucatan Peninsula. *Molecular Biotechnology*, 40: 293–298.

- Taylor, J. W., Geiser, D. M., Burt, A., y Koufopanou, V. (1999). The evolutionary biology and population genetics underlying fungal strain typing. *Clinical Microbiological Reviews*, 12: 126-146.
- Taylor, J. W., Spatafora, J., O'Donnell, K., Lutzoni, F., James, T., Hibbett, D. S., Geiser, D., Bruns, T. D., y Blackwell, M., (2004). The Fungi. In *Assembling the Tree of Life*. Cracraft, J. and Donoghue, M. J. (Ed). Oxford University Press. 171-194.
- Tewari, D. N. (2007). *Jatropha* and Biodiesel. New Delhi: Ocean Books, p. 228.
- Thomas, R., Sah, N. H., y Sharma, P. B. (2008). Therapeutic biology of *Jatropha curcas*: a mini review. *Current pharmaceutical biotechnology*, 9, 315-324.
- Torres-Calzada, C., Tapia-Tussell, R., Nexticapan-Garcez, A., Matin-Mex, R., Quijano-Ramayo, A., Cortés-Velázquez, A., Higuera-Ciapara, I., y Perez-Brito, D. (2011). First report of *Colletotrichum capsici* causing anthracnose in *Jatropha curcas* in Yucatan, Mexico. *New Disease Reports*, 23, 6.
- Treadway, L. P., White, J. F. Jr, Gaut, B. S., Reddy, P. V., Richardson, M. D, y Clarke, B. B. (1999). Phylogenetic relationships within and between *Epichloë* and *Neotyphodium* endophytes as estimated by AFLP markers and rDNA sequences. *Mycological Research*, 103: 1593-1603.
- Turner, A. S., Lees, A. K., Rezanoor, H. N., y Nicholson, P. (1998). Refinement of PCR-detection of *Fusarium avenaceum* and evidence from DNA marker studies for phenetic relatedness to *Fusarium tricinctum*. *Plant Pathology*, 47, 278-288.
- van der Vossen, J. M. B. M., Rahaoui, H., de Nijs, M. W. C. M. y Hartog, B. J. (2003). PCR methods for tracing and detection of yeast in the food chain. *In: Yeast in Food*. Boekhout, T. y Robert, V. (ed.) CRC Press LLC, Boca Raton, FL, USA, 123-138 p.
- Viaud, M., Pasquier, A. y Brygoo, Y. (2000). Diversity of soil fungi studied by PCR-RFLP of ITS. *Mycological Research*, 9: 1027-1032.

- Webster, J. y Weber, R. (2007). Introduction In: Introduction to Fungi. Third Edition. Cambridge University Press, New York, 1-39.
- Weiland, J. J., y Sundsbak, J. L. (2000) Differentiation and detection of sugar beet fungal pathogens using PCR amplification of actin coding sequences and the ITS region of the rRNA gene. *Plant Disease*, 84(4):475–482.
- Welsh, J., y McCelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 18: 7213-8.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., y Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR protocols: a guide to the methods and applications. Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J. (eds.), Academic Press. New York. USA. 315-322.
- Windels, C. E. (2000). Economic and social impacts of *Fusarium* head blight: changing farms and rural communities in the Northern Great Plains. *Phytopathology*, 90(1): 17–21.
- Woods, J. y Estrin, A. (2007). Biodiesel from coconut and *Jatropha* In: The Biomass Assessment Handbook. Earthscan. 218-225 pp.
- Youssef, S. A., Maymon, M., Zveibil, A., Klein-Gueta, D., Sztejnberg, A., Shalaby, A. A., y Freeman, S. (2007) Epidemiological aspects of mango malformation disease caused by *Fusarium mangiferae* and source of infection in seedlings cultivated in orchards in Egypt. *Plant Pathology*, 56:257–263.
- Zarafi, A. B. y Abdulkadir, I. D. (2012). Identification and host range of causal agent of dieback disease on *Jatropha curcas*. *Archives Of Phytopathology and Plant Protection*, 45:9, 1096-1100.

CAPÍTULO II. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS HONGOS ASOCIADOS A *J. curcas*

2.1 INTRODUCCIÓN

La identificación precisa de los hongos fitopatógenos es esencial para todos los aspectos de la patología de las plantas, desde la investigación sobre su biología hasta para el control de las enfermedades que causan (Capote *et al.*, 2012; McCartney *et al.*, 2003), además de que puede contribuir a generar medidas de control efectivas, a reducir los efectos negativos en el ambiente, como el uso desmedido e incorrecto de compuestos químicos, y a la vez originar información respecto a la interacción planta-patógeno (Flores, 1997).

En este sentido, los métodos convencionales de identificación de patógenos fúngicos implican el estudio de los síntomas de la enfermedad en la planta hospedera, el aislamiento y cultivo de los hongos en medios adecuados, la determinación de las características morfológicas, tanto de las esporas como de las colonias y la identificación de las esporas con base a sus características taxonómicas, así como la identificación por pruebas bioquímicas (Narayanasamy, 2011). Las características morfológicas y culturales son consideradas como uno de los principales criterios taxonómicos en la clasificación de los hongos, esto se debe a las variaciones en las características morfológicas de los hongos, las cuales permiten identificarlos a nivel de género y, en algunos casos hasta nivel de especie (Narayanasamy, 2011), tal como es el caso de las especies de *Colletotrichum* en donde ciertas características como: morfología, velocidad de crecimiento de las colonias, forma de los conidios, presencia o ausencia de setas, forma y tamaño de apresorios, temperatura óptima de crecimiento micelial, la existencia del estado teleomorfo, afiliación con una especie hospedera específica y sensibilidad a ciertos fungicidas, son útiles para su diferenciación a nivel de especie (Cai *et al.*, 2009; Peres *et al.*, 2005; Freeman *et al.*, 1998; Sutton, 1992).

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Área de estudio y colecta de material

Para el desarrollo de este proyecto, se consideraron como áreas de estudio los municipios de Muna, Tekax, Tizimín, Mérida y Opichén del Estado de Yucatán, en donde el cultivo de *Jatropha curcas* constituye una actividad agrícola importante (Fig. 2). Se tomaron muestras de tejido vegetal que presentaron síntomas de enfermedad en las diferentes plantaciones de esta especie, se colocaron en bolsas de plástico y se etiquetaron indicando la clave, fecha, y lugar de colecta, posteriormente se trasladaron al laboratorio GeMBio, del Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. para su análisis.

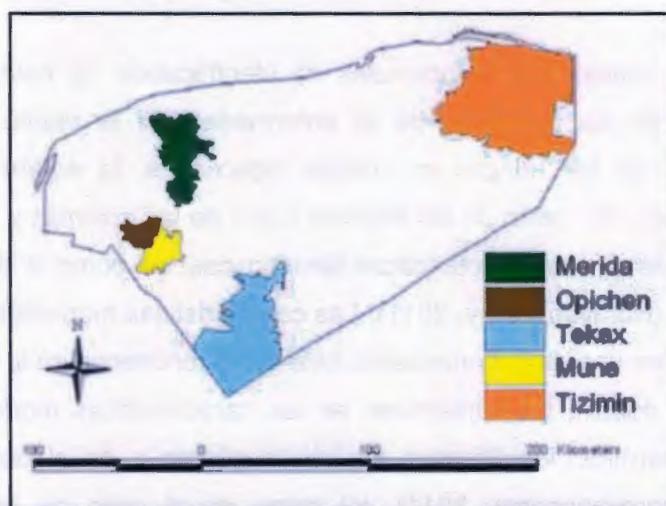


Figura 2. Municipios muestreados en el Estado de Yucatán.

2.2.2 Aislamiento de los hongos

Los tejidos de las plantas fueron incubados en cámaras húmedas de la siguiente manera: se tomaron secciones de tejido afectado de aproximadamente 5 cm², se lavaron con detergente comercial, para eliminar el exceso de polvo y se enjuagaron con agua corriente. Posteriormente, el material vegetal se lavó con una solución de hipoclorito de sodio al 2% (6% de NaClO activo) y se mantuvo en un recipiente con agitación constante por 2 minutos, luego se enjuagó 3 veces con agua destilada estéril, para eliminar el exceso de cloro y se secó con papel absorbente. Seguidamente se colocó en cajas Petri

que contenían en el fondo papel filtro humedecido con agua destilada estéril, para promover la formación de las estructuras fungosas. Las placas se mantuvieron a temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$) y se realizaron observaciones periódicas con el estereoscopio durante los siguientes días, para identificar el micelio o las estructuras reproductivas (cuerpos fructíferos). Una vez que se localizaron dichas estructuras se realizaron siembras directas en cajas Petri con medio de cultivo PDA y se incubaron a $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ y fotoperiodo 12h/12h, para que crecieran.

2.2.3 Purificación de los hongos

Para la purificación de los hongos se utilizó la técnica de punto de hifa a fin de obtener cultivos monospóricos. Se realizaron cultivos en agar-agua a partir de los aislados en incubación (crecido en PDA) de la siguiente manera: se tomó una porción del micelio con ayuda de una aguja estéril y se colocó en una caja Petri nueva que contenía agar-agua para promover el crecimiento separado de las hifas, posteriormente, con una aguja estéril se tomó la punta de una hifa, se sembró en medio PDA y por último las placas se incubaron a $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ y fotoperiodo 12h/12h para que crecieran.

2.2.4. Identificación a nivel de género

La identificación de los hongos se realizó tomando las estructuras reproductivas o micelio joven de las placas en crecimiento, de aproximadamente 7 días de edad. Se realizaron preparaciones semipermanentes como a continuación se describe, se colocaron en un portaobjeto dos gotas de azul de lactofenol y con la ayuda de una aguja estéril, se colocó en él una porción de micelio o cuerpo fructífero del hongo. La preparación se observó en el microscopio, utilizando el objetivo 40X, y las estructuras se compararon con lo reportado en las claves morfométricas de Barnett y Hunter (1998) y Watanabe (2002). También se comparó el tamaño, la forma y el color de las esporas y sus estructuras reproductivas.

2.2.5. Caracterización morfológica

2.2.5.1 Características de las colonias

Los aislados puros de aproximadamente 5 días de edad fueron utilizados para la caracterización de las colonias. Por cada aislado se tomaron 5 discos de micelio de 8 mm de diámetro cerca del borde en crecimiento, posteriormente estos fueron colocados cuidadosamente con la ayuda de una aguja estéril en cajas Petri que contenían PDA y se mantuvieron bajo condiciones controladas de luz/oscuridad (12h/12h) y de temperatura ($28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$).

Todas las placas fueron marcadas en el reverso con dos líneas perpendiculares para medir el diámetro de las colonias cada 24 horas, la medición se realizó por aproximadamente 7 días o hasta que la colonia cubriera toda la placa. Se realizaron 2 mediciones (sobre las líneas trazadas) por cada réplica y el promedio de estos datos fue considerado para calcular la velocidad de crecimiento de cada aislado.

Por otro lado, antes de que las cepas cubrieran toda la placa, se describieron las características macroscópicas de los aislados, se tomó en consideración, la forma, el margen, el color de la colonia (anverso y reverso), así como el color y la distribución de los mismos en la caja Petri.

2.2.5.2 Características de las esporas

Una vez que se observó la esporulación de las cepas crecidas en PDA (bajo las condiciones antes mencionadas), se realizaron preparaciones semipermanentes para cada uno de los aislados. A 30 esporas seleccionadas al azar en la preparación, se les midió el largo y ancho de manera individual utilizando el microscopio a 100X y también se observó la forma, el color y el número de septos de las mismas.

2.2.6. Análisis estadístico

Para analizar estadísticamente la velocidad de crecimiento y morfología de los conidios (largo y ancho), se utilizó el programa estadístico Statgraphics Centurion XVI versión 16.1.18. Se empleó el análisis de varianza ANOVA con el fin de determinar las diferencias significativas en la velocidad de crecimiento y dimensiones de conidios de todos los aislados. Las medias se compararon utilizando la prueba de diferencia mínima significativa (DMS o LSD).

2.2.7. Pruebas de patogenicidad (Postulados de Koch)

Se germinaron semillas sanas de *Jatropha curcas*, las cuales fueron colectadas en la localidad de Tekax. Primeramente, se desinfectó la superficie de las semillas con hipoclorito de sodio al 2% (6% de NaClO activo) por 2 min, luego se remojó en una solución de Procloraz (1ml/L) por 24 horas, para que se rehidrataran. Después se colocaron en bandejas de plástico que contenían algodón estéril humedecido con agua destilada estéril. Las bandejas se mantuvieron a temperatura ambiente y fueron cubiertas con bolsas oscuras, para evitar la luz y mantener la humedad del algodón. Seguidamente, las plantas fueron trasplantadas a bolsas plásticas de 25 × 35 cm que contenían suelo y se mantuvieron en condiciones controladas en el invernadero. Por último, las plantas fueron regadas cada segundo día con aplicación de fertilizantes (Nitrato de Potasio (1 g/L) Nitrato de Magnesio (0.5 g/L), Triple ultra sol 18-18-18 (1.5 g/L) y Xtra alga (2 mL/L)).

Plantas de aproximadamente 6 meses de edad, fueron inoculadas para verificar la patogenicidad de los aislados. En el caso de los aislados fungosos foliares, se asperjaron 3 plantas con una suspensión de conidios (1×10^6 conidios/ml), posteriormente, las plantas se colocaron en charolas que contenían agua y se cubrieron con una bolsa de plástico, para propiciar las condiciones de humedad y evitar posibles contaminaciones (Torres-Calzada *et al.*, 2011). Este mismo procedimiento se usó para las plantas control, las cuales únicamente fueron asperjadas con agua.

Para los aislados provenientes del tallo, la inoculación se realizó insertando un disco de micelio en el tallo de la planta de la siguiente manera: con ayuda de un sacabocados

Capítulo II

estéril de 10 mm de diámetro se realizó una herida de aproximadamente 2 mm de profundidad en el tallo, se eliminó la corteza y se sustituyó con un disco de PDA con micelio, y posteriormente el sitio de inoculación se cubrió con algodón húmedo y parafilm. Las plantas control fueron tratadas de la misma forma, pero en este caso se utilizaron discos de PDA sin micelio para la inoculación. Todas las plantas se colocaron en las charolas de plástico con agua y se cubrieron con bolsas de plástico (Sulaiman *et al.*, 2012; Fujinawa *et al.*, 2012; Latha *et al.*, 2009).

En ambos casos, las charolas se mantuvieron a 80% de humedad relativa y $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ y se realizaron observaciones cada tercer día, a fin de encontrar síntomas característicos de la enfermedad. Los postulados de Koch se concluyeron al realizar la identificación de los re-aislados de los hongos en las lesiones que aparecieron en las plantas inoculadas.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Aislamiento e identificación de hongos

En la figura 3 se pueden apreciar los principales síntomas fungosos que afectan al cultivo de *J. curcas* en Yucatán. Manchas color marrón y halo amarillo en la hoja, (a), manchas oscuras en los frutos (b), así como daño en raíces (c) y necrosis en el ápice (d).

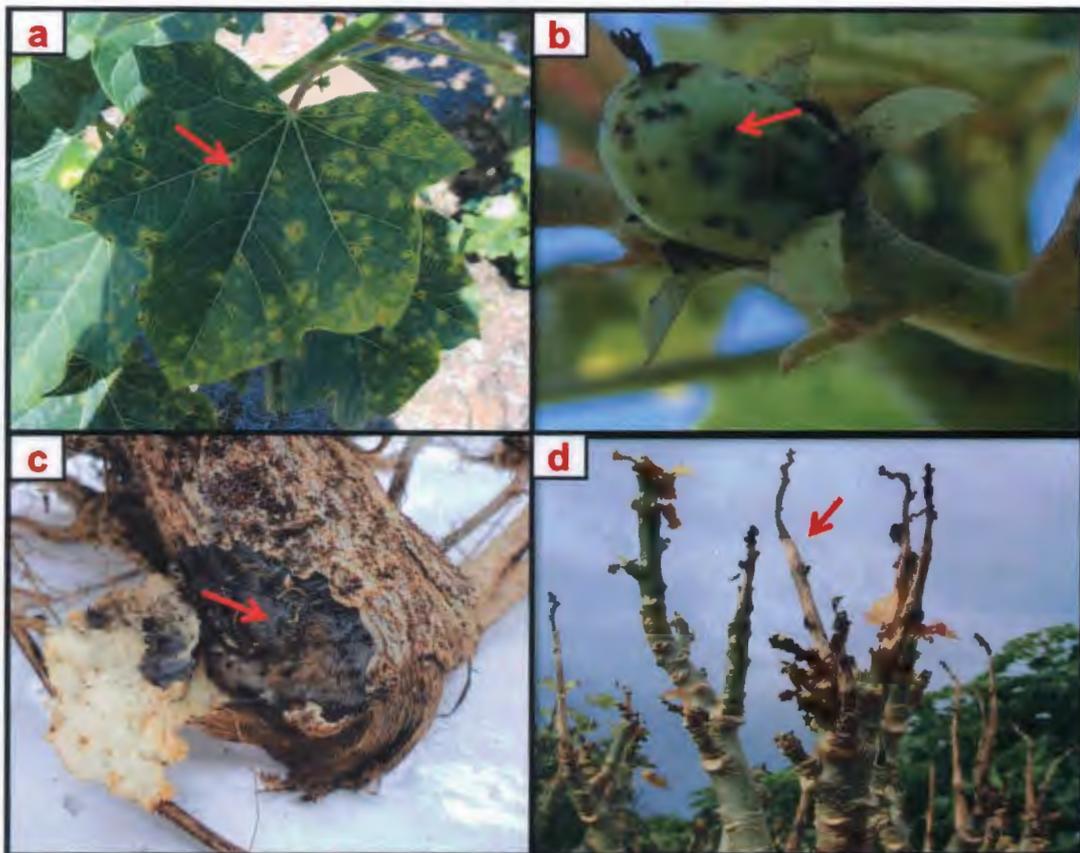


Figura 3. Lesiones observadas en a) hoja b) fruto c) raíz y d) brote apical de *Jatropha curcas*.

A partir de estos daños se obtuvieron 54 aislados divididos en 4 géneros: *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Alternaria* y *Lasiodiplodia* (Cuadro 5), donde se puede observar que la mayoría de los aislados fueron de hoja (73.91%), seguidos del ápice del tallo (10.56%), tallo (6.52%), fruto (4.34%) y raíz (2.17%).

Cuadro 5. Aislados fungosos de *Jatropha curcas* obtenidos en este estudio.

Género o especie	Tejido	Localidad	Clave del aislado
<i>C. gloeosporioides</i>	Fruto	Ayim, Tekax	JG21
	Ápice	Ayim, Tekax	JG23
	Hoja	Ayim, Tekax	JG12
	Hoja	Ayim, Tekax	JG15
	Hoja	Ayim, Tekax	JG19
	Hoja	Ayim, Tekax	JG35
	Hoja	Ayim, Tekax	JG36
	Hoja	Ayim, Tekax	JG46
	Hoja	Ayim, Tekax	JG47
	Hoja	Mérida	JG26
	Hoja	Mérida	JG27
	Hoja	Mérida	JG29
	Hoja	Mérida	JG33
	Hoja	Mérida	JG38
	Hoja	Mérida	JG41
	Hoja	Mérida	JG43
	Hoja	Mérida	JG44
	Hoja	Mérida	JG51
	Hoja	Mérida	JG53
	Hoja	Mérida	JG54
<i>C. capsici</i>	Ápice	Ayim, Tekax	JG18
	Hoja	Ayim, Tekax	JG13
	Hoja	Ayim, Tekax	JG16
	Hoja	Ayim, Tekax	JG20
	Hoja	Mérida	JG28
	Hoja	Mérida	JG37
	Hoja	Mérida	JG39
	Hoja	Mérida	JG42
	Hoja	Opichén	JG56
	Hoja	Opichén	JG61
<i>Fusarium</i> sp.	Fruto	Ayim, Tekax	JG22
	Ápice	Ayim, Tekax	JG25
	Ápice	Ayim, Tekax	JG50
	Ápice	Tizimín	JG3
	Raíz	Muna	JG4
	Tallo	Muna	JG2

Género o especie	Tejido	Localidad	Clave del aislado
<i>Fusarium</i> sp.	Hoja	Mérida	JG55
	Hoja	Opichén	JG58
	Hoja	Opichén	JG59
	Hoja	Opichén	JG62
	Hoja	Opichén	JG64
	Hoja	Opichén	JG65
	Hoja	Opichén	JG66
	Hoja	Opichén	JG67
<i>Alternaria</i> sp.	Ápice	Ayim, Tekax	JG24
	Hoja	Ayim, Tekax	JG14
	Hoja	Mérida	JG32
	Hoja	Mérida	JG49
	Hoja	Mérida	JG52
	Hoja	Opichén	JG57
	Hoja	Opichén	JG63
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	Tallo	Tizimín	JG6
	Tallo	Tizimín	JG7
	Tallo	Muna	JG8

Los géneros *Colletotrichum* y *Fusarium* fueron los que tuvieron una mayor frecuencia de aparición en la mayoría de los órganos muestreados. El género de *Lasiodiplodia* únicamente fue aislado del tallo de las plantas, mientras que *Alternaria* sp. fue aislada de hojas y ápice del tallo (Cuadro 5).

Por claves morfométricas sólo se pudo identificar a nivel de especie el género *Colletotrichum* en *C. gloeosporioides* y *C. capsici* (Fig. 4). Los conidios de *C. gloeosporioides* son cilíndricos, unicelulares, hialinos y sus extremos son redondos (Fig. 4a) mientras que los de *Colletotrichum capsici* son falcados, en forma de canoa o de media luna, hialinos y con extremos agudos (Fig. 4b); esta especie no fue objeto de este estudio ya que ha sido reportada y caracterizada en *Jatropha curcas* por Torres-Calzada *et al.*, (2011).

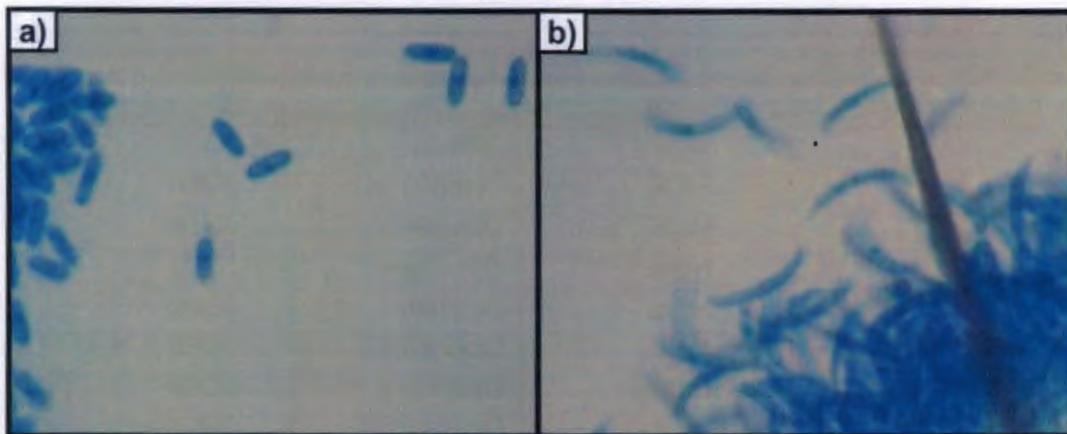


Figura 4. a) Conidios de *C. gloeosporioides* y b) conidios de *C. capsici*.

Los conidios de *Fusarium* sp. son hialinos y pueden ser de dos tipos: macroconidios que son estructuras largas en forma de media luna y se encuentran septados, mientras que los microconidios son esféricos u ovalados y se encuentran formados por una o dos células (Fig. 5).

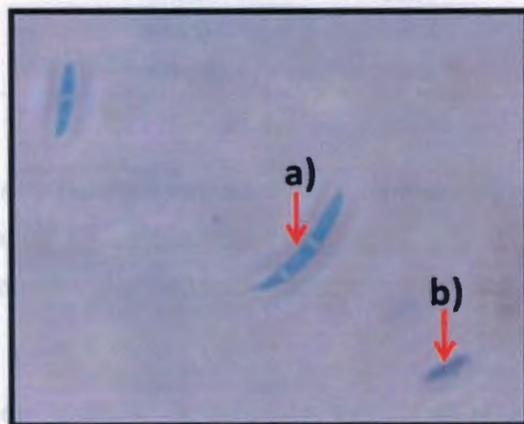


Figura 5. a) Macro y b) microconidios de *Fusarium* sp.

El género *Alternaria* sp. se caracteriza por tener conidios catenulados (en cadena), los cuales son cilíndricos o en forma de huso, color marrón oscuro y se encuentran septados transversal y longitudinalmente (Fig. 6).

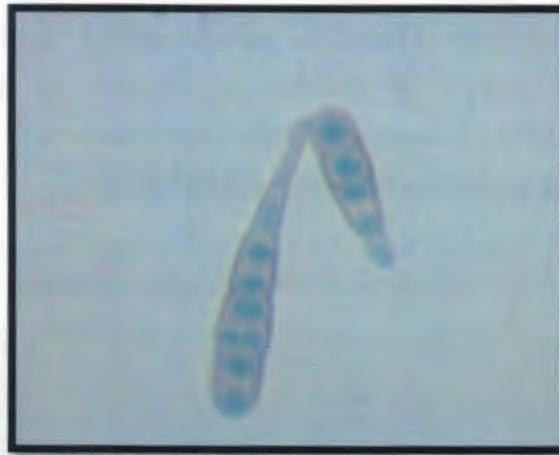


Figura 6. Conidios de *Alternaria* sp.

En el caso de *Lasiodiplodia* sp., se pueden observar conidios inmaduros (Fig. 7a) que son elipsoidales, unicelulares, hialinos; y los conidios maduros tienen una coloración café oscura, presentan un solo septo y estrías longitudinales (Fig. 7b).

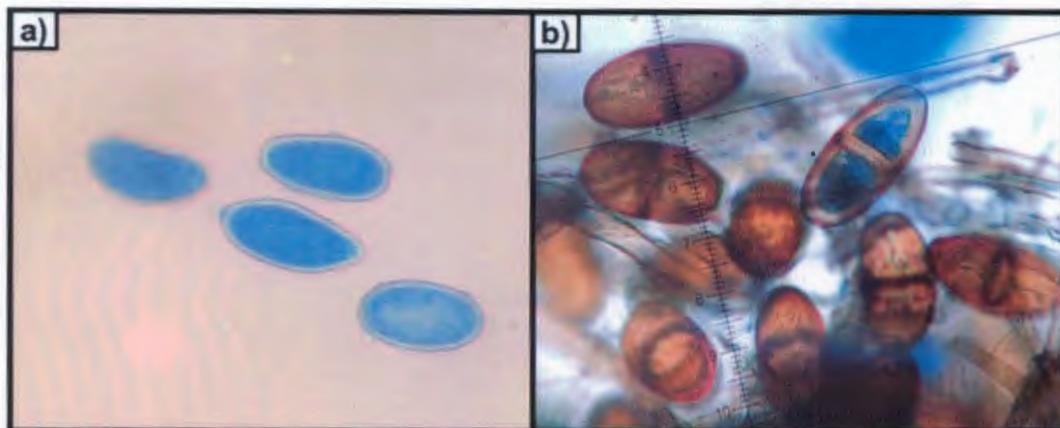


Figura 7. a) conidios inmaduros y b) conidios maduros de *Lasiodiplodia* sp.

2.3.2 Caracterización morfológica

2.3.2.1 *Colletotrichum gloeosporioides*

Como se muestra en la figura 8, los aislados de *C. gloeosporioides* se dividieron en 5 morfotipos. En todos los grupos la forma de las colonias fue circular con margen entero (Cuadro 6). El mayor número de aislados se encontró en los morfotipos 4 y 3, representando un 40 y 35% del total de aislados respectivamente, mientras que en los morfotipos 2 y 5 sólo se encontró un 5% del total de aislados.

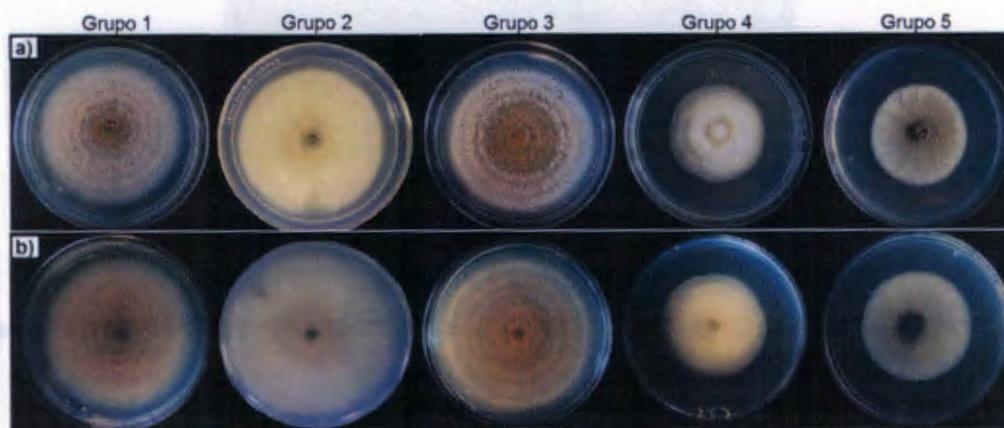


Figura 8. Morfotipos de *Colletotrichum gloeosporioides* a los 7 días de edad. a) anverso y b) reverso de la placa.

Cuadro 6. Características morfológicas de *Colletotrichum gloeosporioides*.

Grupo	No. de aislamiento	Clave de aislamiento	Forma	Margen	Descripción de la colonia	Velocidad de crecimiento (mm/día)	Conidios	
							Largo (µm)	Ancho (µm)
1	3	JG29, JG33, JG47	Circular	Entero	Micelio algodonoso. Blanco, con masa de conidios naranja en el centro.	10.38 ± 0.17b	13.86 ± 0.30c	3.93 ± 0.20cd
2	1	JG23	Circular	Entero	Micelio algodonoso denso. Blanco, con masa de conidios naranja en el centro.	10.69 ± 0.37b	13.80 ± 0.55c	4.03 ± 0.32d
3	7	JG19, JG35, JG43, JG44, JG51, JG53, JG54	Circular	Entero	Micelio algodonoso. Blanco-naranja, con conidios naranja formando anillos concéntricos.	10.40 ± 0.04b	13.09 ± 0.26b	3.89 ± 0.15c
4	8	JG12, JG21, JG26, JG27, JG36, JG38, JG41, JG46	Circular	Entero	Micelio algodonoso denso. Blanco, sin masa de conidios visible.	8.20 ± 0.17a	12.79 ± 0.45a	3.73 ± 0.18b
5	1	JG15	Circular	Entero	Micelio algodonoso escaso. Gris oscuro, con masa de conidios gris oscuro en el centro.	8.58 ± 0.23a	13.06 ± 0.52b	3.13 ± 0.35a

Los valores numéricos seguidos de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente, según lo determinado en la prueba de diferencia mínima significativa (DMS o LSD) a un nivel de significación de $P \leq 0.05$.

2.3.2.2 *Fusarium* sp.

Dentro de los géneros de hongos aislados de *Jatropha curcas*, sin lugar a dudas el más variable fue *Fusarium* sp. Lo que se tradujo en los siete morfotipos descritos en la Figura 9 y el Cuadro 7.

Como se aprecia en el cuadro 7, el morfotipo 4 agrupó el mayor número de aislados (35%) los cuales procedían en su mayor parte de Opichén. Estos aislados fueron encontrados en las cinco localidades bajo de estudio, en Tekax se encontraron a los grupos 4, 5 y 6; en Muna a los grupos 2 y 3; mientras que en Mérida y Tizimín únicamente se hallaron a los grupos 4 y 3 respectivamente, y finalmente en Opichén encontramos a la mayoría de los grupos (1, 2, 4, 6 y 7).

De todos los morfotipos, 7, 6 y 1 presentaron las velocidades de crecimiento más lentas (de 3 a 6 mm/día), en comparación con los demás grupos (superiores a 10 mm/día). También se puede observar, que el grupo 7 se distingue por las dimensiones de sus conidios, que fueron los de mayor longitud y ancho, y presentaron el mayor número de septos.

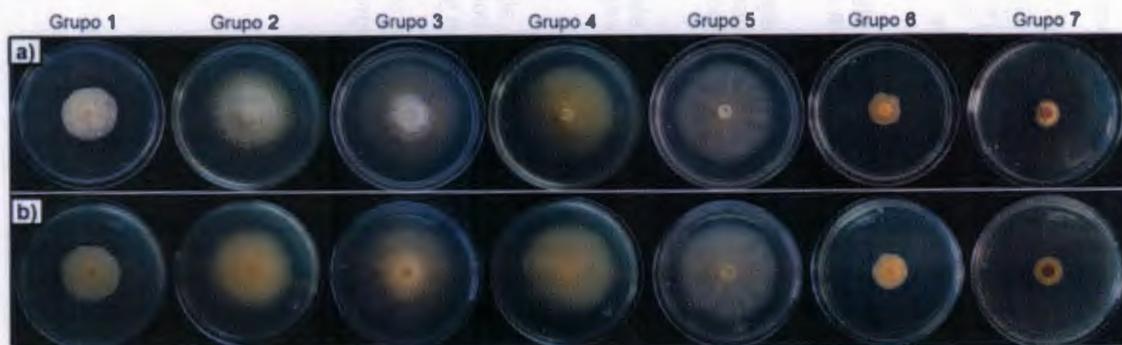


Figura 9. Morfotipos de *Fusarium* sp. a los 4 días de edad. a) anverso y b) reverso de la placa.

Cuadro 7. Características morfológicas de *Fusarium* sp.

Grupo	No. de aislamiento	Clave de aislamiento	Forma	Margen	Descripción de la colonia	Velocidad de crecimiento (mm/día)	Conidios		
							Largo (µm)	Ancho (µm)	No. de septos
1	1	JG66	Circular	Ondulado	Micelio algodonoso denso. Salmón claro.	6.63 ± 0.41c	27.13 ± 0.81b	3.26 ± 0.44ab	3-4
2	2	JG4, JG62	Circular	Entero	Micelio algodonoso en el centro y ralo en el borde. Salmón claro.	10.86 ± 0.15d	33.45 ± 0.64d	3.95 ± 0.33ce	4-6
3	2	JG2, JG3	Circular	Entero	Micelio algodonoso denso en el punto de inoculación y ralo en el borde. salmón claro	15.56 ± 0.30g	23.26 ± 0.59a	3.16 ± 0.33a	3-4
4	5	JG25, JG55, JG59 JG64, JG65	Circular	Entero	Ralo. Naranja claro.	12.63 ± 0.30e	35.78 ± 0.48e	4.01 ± 0.19e	4-6
5	1	JG22	Circular	Rizoide	Ralo y filamentosos. Salmón claro	14.43 ± 0.75f	40.43 ± 0.77f	3.83 ± 0.37c	5-6
6	2	JG50, JG58	Circular	Ondulado	Ralo. Naranja	4.46 ± 0.30b	30.96 ± 0.66c	3.41 ± 0.32b	3-5
7	1	JG67	Circular	Entero	Aterciopelado. Amarillo a rojo con formación de anillos concéntricos	3.06 ± 0.15a	99.2 ± 0.80g	5.00 ± 0.00f	6-7

Los valores numéricos seguidos de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente, según lo determinado en la prueba de diferencia mínima significativa (DMS o LSD) a un nivel de significación de $P \leq 0.05$.

2.3.2.3 *Alternaria* sp.

De los 7 aislados de *Alternaria* sp., se formaron 4 grupos morfológicos (Fig. 10). Como se presenta en el cuadro 8, el mayor número de aislados se agruparon en el morfotipo 1, a diferencia del resto, que sólo estuvieron representados por un solo aislado cada uno. El morfotipo 1 se caracterizó por tener la mayor velocidad de crecimiento y que el origen de las cepas fue de dos localidades muy cercanas geográficamente (Mérida y Opichén). De manera general los morfotipos se diferenciaron básicamente por la coloración del micelio y por el largo y ancho de los conidios. Destacando el morfotipo 4, cuyos conidios midieron casi el doble de largo en relación a los otros grupos y sin embargo tuvieron el menor valor de ancho.

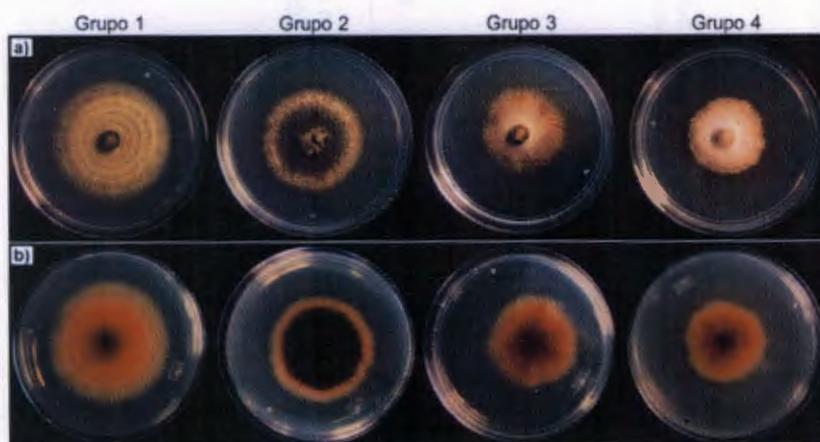


Figura 10. Morfotipos de *Alternaria* sp. a los 6 días de edad. a) anverso y b) reverso de la placa.

Cuadro 8. Características morfológicas de *Alternaria* sp.

Grupo	No. de aislamiento	Clave de aislamiento	Forma	Margen	Descripción de la colonia	Velocidad de crecimiento (mm/día)	Conidios	
							Largo (µm)	Ancho (µm)
1	4	JG32, JG52, JG57, JG63	Circular	Rizoide	Micelio algodonoso. Beige a café claro. Formación de anillos concéntricos.	8.90 ± 0.10c	38.66 ± 0.34a	13.97 ± 0.35b
2	1	JG49	Circular	Rizoide	Micelio algodonoso. Café claro a gris oscuro. Margen café claro.	8.66 ± 0.25c	38.33 ± 0.33a	14.46 ± 0.62b
3	1	JG14	Circular	Rizoide	Micelio algodonoso. Café oscuro a blanco. Micelio blanco cerca del punto de inoculación.	7.36 ± 0.31b	38.16 ± 0.33a	13.36 ± 0.61b
4	1	JG24	Circular	Rizoide	Micelio algodonoso. Café claro a blanco.	5.43 ± 0.15a	57.73 ± 0.33b	12.33 ± 0.47a

Los valores numéricos seguidos de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente, según lo determinado en la prueba de diferencia mínima significativa (DMS o LSD) a un nivel de significación de $P \leq 0.05$.

Cuadro 9. Características morfológicas de *Lasiodiplodia* sp.

Grupo	No. de aislamiento	Clave de aislamiento	Forma	Margen	Descripción de la colonia	Velocidad de crecimiento (mm/día)	Conidios		
							Largo (µm)	Ancho (µm)	No. de septos
1	1	JG6	Circular	Ondulado	Micelio aéreo abundante blanco a gris oscuro cerca del punto de inoculación.	32.84 ± 0.38a	28.16 ± 0.83a	14.20 ± 0.48a	1
2	2	JG7, JG8	Circular	Ondulado	Micelio aéreo escaso. Blanco. Micelio abundante en el borde.	32.29 ± 0.42a	28.16 ± 0.44a	13.98 ± 0.42a	1

Los valores numéricos seguidos de la misma letra en la misma columna no difieren significativamente, según lo determinado en la prueba de diferencia mínima significativa (DMS o LSD) a un nivel de significación de $P \leq 0.05$.

2.3.2.4 *Lasiodiplodia* sp.

El género *Lasiodiplodia*, fue uno que presentó menor número de aislados, y sólo se aisló del tallo de la planta. Únicamente se formaron dos grupos morfológicos (Fig. 11) que se diferencian en la densidad del micelio al centro de la colonia, donde el morfotipo 1 es más denso que el 2. Es importante destacar que ambos morfotipos se encontraron en la zona oriente del estado (municipio de Tizimín). En el cuadro 9, se muestran sus características, así como los valores de velocidad de crecimiento, longitud de los conidios y número de septos, como se aprecia no se encontraron diferencias significativas para estos parámetros entre los morfotipos.

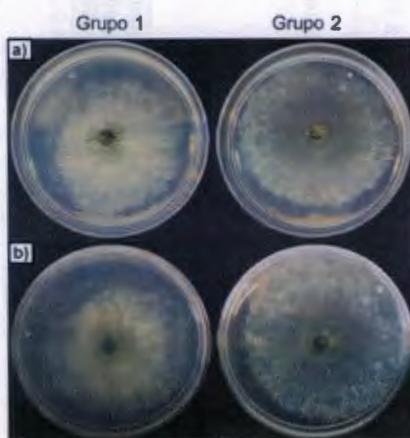


Figura 11. Morfotipos de *Lasiodiplodia* sp. a los 2 días de edad a) anverso y b) reverso de la placa.

2.3.3 Pruebas de patogenicidad

En todos los aislados fungosos de los distintos géneros se pudo corroborar la patogenicidad mediante los postulados de Koch.

2.3.3.1 *Colletotrichum gloeosporioides*

Los síntomas en plantas inoculadas con la suspensión de conidios de *Colletotrichum gloeosporioides*, aparecieron a los 19 días después de la inoculación. Se observó la presencia de manchas circulares en el centro de la hoja y manchas irregulares en el borde de las mismas, en ambos casos estas manchas fueron de color café claro y presentaron

un halo amarillo, (Fig. 12b). También las hojas nuevas fueron afectadas, en estas se observó la presencia de las manchas irregulares además del enrollamiento del borde de las mismas.



Figura 12. Plantas de *Jatropha curcas*: a) testigo, b) inoculada con *C. gloeosporioides*.

En la figura 13a se muestran los acérvulos que se formaron en las lesiones de las hojas, así como los conidios de *C. gloeosporioides* que se observaron después de reaislarlos (Fig. 13b), lo cual confirma que *C. gloeosporioides* es patogénico para *Jatropha curcas*.

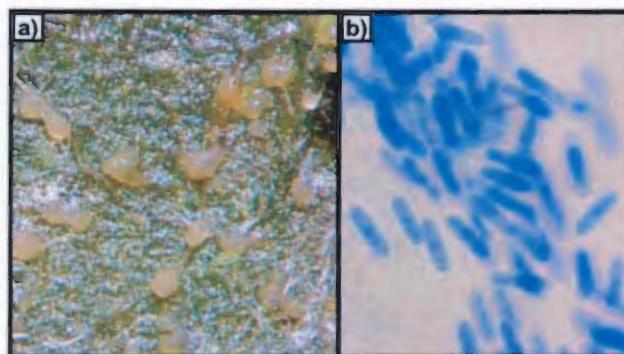


Figura 13. a) Acérvulos en hoja; b) conidios de *C. gloeosporioides* reaislados de las lesiones.

2.3.3.2 *Fusarium* sp.

Después de 6 días de inoculación, las plantas expuestas a la suspensión de conidios de *Fusarium* sp, presentaron el síntoma de marchitez en hojas y pudrición de peciolo, se observó que las hojas inferiores se tornaron amarillas y posteriormente senescentes (Fig. 14b).



Figura 14. Planta de *Jatropha curcas*: a) testigo, b) inoculada con *Fusarium* sp.

La identificación mediante claves morfométricas de los conidios reaislados, confirmó la patogenicidad de *Fusarium* sp. en *Jatropha curcas* (Fig. 15).



Figura 15. Conidios de *Fusarium* sp. reaislados en lesiones de *J. curcas*.

2.3.3.3 *Alternaria* sp.

Las plantas inoculadas con la suspensión de conidios de *Alternaria* sp., desarrollaron síntomas después de 8 días de la inoculación. Se observó el amarillamiento de las hojas (Fig. 16b) y pequeñas manchas oscuras dispersas en toda la hoja, tanto en hojas amarillas como hojas que se mantenían verdes, en donde se observó micelio blanco como se muestra en la figura 16b. Estos síntomas no fueron observados en la planta control (Fig. 16a).



Figura 16. Planta de *J. curcas*: a) testigo, b) planta inoculada con *Alternaria* sp. hojas con manchas oscuras, y micelio blanco en lesiones de hoja.

Con la identificación de los conidios reaislados de las lesiones observadas, se corroboró la patogenicidad de *Alternaria* sp., en *Jatropha curcas* (Fig. 17).

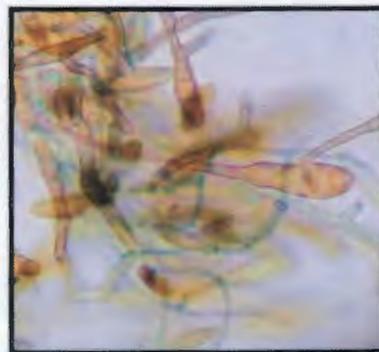


Figura 17. Conidios de *Alternaria* sp. reaislados de lesiones de *J. curcas*

2.3.3.4 *Lasiodiplodia* sp.

A los 10 días después de la inoculación con *Lasiodiplodia* sp. en el tallo de las plantas, se observaron los primeros síntomas que consistieron en el amarillamiento y defoliación de hojas (Fig. 18b) en las plantas inoculadas, pero no así en las plantas testigo (Fig. 18a). En la figura 18c se muestran los daños ocasionados por el patógeno en el tallo.



Figura 18. Plantas de *J. curcas*: a) Testigo y b) planta inoculada con *Lasiodiplodia* sp., mostrando los primeros síntomas, c) lesión en el tallo de la planta inoculada

La identificación mediante claves morfométricas de las estructuras fungosas reaisladas, indicó que *Lasiodiplodia* sp. es patógeno de *Jatropha curcas*. En la figura 19 se muestran los conidios inmaduros y maduros de este hongo reaislados en las lesiones de la planta.

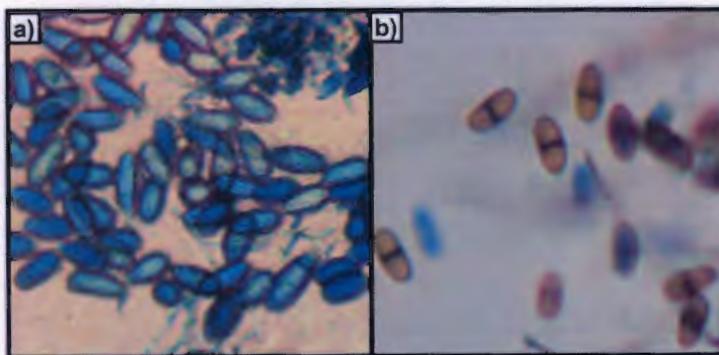


Figura 19. a) Conidios inmaduros y c) conidios maduros de *Lasiodiplodia* sp.

2.4 DISCUSIÓN

Los géneros *Colletotrichum* y *Fusarium* fueron los que se encontraron en mayor número de aislados en diferentes órganos de *J. curcas*.

En el caso de *Colletotrichum gloeosporioides* se encontró colonizando principalmente a las hojas, aunque también se aisló del ápice del tallo y del fruto. Esto coincide con lo reportado por Jin-Hyeuk *et al.*, (2012) en *Jatropha curcas* en Corea, quién identificó a *Colletotrichum gloeosporioides* como el agente causal de la enfermedad llamada antracnosis en *Jatropha*. Las lesiones irregulares observadas en las hojas nuevas coinciden con lo reportado por Sá *et al.*, (2011) y Santos *et al.*, (2013).

De acuerdo a las características morfológicas de los aislados, se separaron en cinco morfotipos, los cuales coinciden en la apariencia con los grupos del 1 al 5 reportados por Torres-Calzada *et al.*, (2012) en *Carica papaya* L; así mismo los grupos 2 y 3 de este estudio son similares a los grupos 1 y 2 reportados por Photita *et al.*, (2005) en varios cultivos. También el grupo 4 aquí descrito coincide con el morfotipo 4 caracterizado por Rampersad, (2011).

Es importante destacar que el caso del reporte de Torres-Calzada *et al.*, (2012) se hallaron 6 morfotipos de *C. gloeosporioides* y en este estudio se encontraron 5 de ellos, sólo el morfotipo 6 no estuvo presente. Esto indica la alta variabilidad a nivel morfológico que hay en la Península de Yucatán en esta especie de hongo, ya que a pesar de que los hospederos son cultivos diferentes, se hallaron prácticamente todos los morfotipos reportados y en frecuencias de aislados muy parecidas, puesto que el morfotipo 3 presentó en ambos estudios un mayor número de cepas.

Todos los grupos morfológicos descritos se observaron en Tekax, mientras que en Mérida sólo se observaron los morfotipos 1, 3 y 4. Los postulados de Koch indicaron que esta especie es patogénica para *Jatropha curcas* y éste sería el primer reporte de antracnosis causada por *C. gloeosporioides* afectando a *J. curcas* en México. Esto coincide con reportes previos de esta enfermedad, como una de las más importantes en el cultivo de *J. curcas* en Brasil y la India, donde ocasiona importantes pérdidas económicas en la producción (Carels, 2009; Suryanarayana, 2010).

Otro género aislado fue *Fusarium* sp., el cual se encontró colonizando la mayoría de los órganos de las plantas. La caracterización morfológica de los 14 aislados arrojó siete morfotipos bien diferenciados. En cuanto a sus características culturales estos fueron semejantes en apariencia a lo reportado por Qi, *et al.*, (2013) en *Mangifera indica*, Sutthisa *et al.*, (2010) en *Morus alba* L.), y también a lo descrito por Shahnazi *et al.*, (2012) en *Piper nigrum*, El-Kazzaz *et al.*, (2008) en diversos hospederos y Arruda *et al.*, (2005) en *Glycine max*.

El morfotipo 7 de *Fusarium* sp, mostró características muy diferentes al resto de los aislados, en cuanto al tamaño de los conidios y velocidad de crecimiento, lo cual coincide con la morfología reportada por Qi, *et al.*, (2013) para *F. decemcellulare* en mango en China. Esto apunta a la posibilidad de que la cepa JG67 representante del morfotipo 7 sea esta especie.

La patogenicidad de estos aislados se corroboró con los postulados de Koch, en donde una de las lesiones más observadas fueron las manchas en las hojas, aunque también se presentó la pudrición de los peciolo y el amarillamiento de las hojas. Este último síntoma, ha sido reportado como uno de los síntomas que conducen a la pudrición de la raíz de *Jatropha curcas*, la cual es causada por *Fusarium solani* en China y *Fusarium moniliforme* en la India (Wu *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2001). En Nigeria, también se ha reportado que este género es el agente causal de la pudrición del tallo, la muerte regresiva y el tizón de las hojas de *Jatropha* (Zarafi y Abdulkadir, 2012 y Zarafi y Abdulkadir, 2013).

Los siete aislados de *Alternaria* sp. formaron 4 grupos morfológicos, los cuales coinciden en número por lo reportado por Pryor y Michailides, (2002), pero no coinciden en cuanto a las características de las colonias. Debido a que no existen muchos trabajos con respecto a la caracterización morfológica de este género, el presente estudio constituye un aporte importante para conocer la diversidad morfológica de *Alternaria* sp. en la Península de Yucatán

La patogenicidad de *Alternaria* sp. para el cultivo de *Jatropha curcas*, ya ha sido reportada por Kumar *et al.*, 2009, quienes identificaron a *Alternaria* sp. como el agente causal de las manchas foliares de esta planta en la India. La importancia de este patógeno, radica en que además se ha reportado causando la pudrición de los frutos en la India y el tizón de

las inflorescencias de *Jatropha curcas* en Sonora, México (Kumar *et al.*, 2012; Espinoza-Verduzco *et al.*, 2012), en donde afectan de manera considerable la producción, de ahí la importancia de identificar estos hongos para poder lograr un buen control.

El género *Lasiodiplodia* con base en sus características morfológicas se separó en dos grupos morfológicos. La variación morfológica observada entre estos aislados coincide con lo reportado con Sangeetha *et al.*, (2012) en plátano y por Shah *et al.*, (2010) en pera. También coincide con las observaciones de los tres aislados, respecto a la distribución de los picnidios en las colonias en cajas Petri, a partir de los 30 días de edad. Los síntomas de amarillamiento y defoliación observados en las plantas coinciden con lo reportado por Kumar *et al.*, (2013) y Latha *et al.*, (2009) en la India y Pereira *et al.*, (2009) en Brasil. La importancia de este patógeno en otros países en este cultivo es alta, por ejemplo en Malasia, ha causado pérdidas de hasta el 80% de las plantaciones (Sulaiman *et al.*, 2012).

2.5 REFERENCIAS

- Arruda, G. M. T., Miller, R. N. G., Ferreira, M. A. S. V., y Café-Filho, A. C. (2005). Morphological and molecular characterization of the sudden-death syndrome pathogen of soybean in Brazil. *Plant Pathology*, 54, 53–65.
- Barnett, H. L., y Hunter, B. B. (1998). Illustrated genera of imperfect fungi. Third edition. APS press. St. Paul, Minnesota, USA. 218 p.
- Cai, L., Hyde, K. D., Taylor, P. W. J., Weir, B. S., Waller, J., Abang, M. M., Zhang, J. Z., Yang, Y. L., Phoulivong, S., Liu, Z. Y., Prihastuti, H., Shivas, R. G., McKenzie, E. H. C., y Johnston, P. R. (2009). A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. *Fungal Diversity*, 39: 183-204.
- Capote, N., Pastrana, A. M., Aguado, A., y Sánchez-Torres, P. (2012). Molecular Tools for Detection of Plant Pathogenic Fungi and Fungicide Resistance, Plant Pathology, Christian Joseph Cumagun (Ed.), InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/plantpathology/molecular-tools-for-detection-of-plant-pathogenic-fungi-and-fungicide-resistance>.
- Carels, N. (2009) *Jatropha curcas*: a review (Chapter 2). In: Kader JC, Delseny M. (eds) *Advances in Botanical Research*. New York, Academic Press, 39–86.
- El-Kazzaz, M. K., El-Fadly, G. B., Hassan, M. A. A., y El-Kot, G. A. N. (2008). Identification of some *Fusarium* spp. using Molecular Biology Techniques. *Egyptian Journal of Phytopathology*, 36 (1-2): 57-69.
- Espinoza-Verduzco, M. de los A., Santos-Cervantes, M. E., Fernández-Herrera, E., Espinoza-Mancillas, M. G., Chávez-Medina, J. A., Bermúdez-Álvarez, E. M. Martínez-Ayala, A. L., Méndez-Lozano, J., y Leyva-López, N. E. (2012): First report of *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler causing inflorescence blight in *Jatropha curcas* in Sinaloa, Mexico, *Canadian Journal of Plant Pathology*.

- Flores, O. A. (1997). Nuevas tecnologías en la detección y el análisis genético de fitopatógenos. *Fitopatología*, 32 (2).
- Freeman, S., Katan, T., Shabi, E. (1998). Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. *Plant Diseases*, 82: 596-605.
- Fujinawa, M. F., de Carvalho Pontes, N., Santos do Carmo de Souza, E., de Goes, A., y do Vale, H. M. M. (2012). First report of *Lasiodiplodia theobromae* causing stem rot disease of begonia (*Begonia x elatior* hort.) in Brazil. *Australasian Plant Diseases Notes*.
- Jin-Hyeuk K, Choi O, Kim J y Kwak Y (2012) First report of Anthracnose disease on *Jatropha curcas* caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in Korea. *Journal Phytopathology*, 160(5): 255–257.
- Kumar, R., Kumari, A., Sinha, A., y Maurya, S. (2013). New report of *Lasiodiplodia theobromae* causing *Jatropha* decline in Eastern Plateau and Hill region of India, *Archives Of Phytopathology and Plant Protection*.
- Kumar, R., Sinha, A., Singh, S. R., y Kamil, D. (2009). Incidence of a Leaf Spot Disease in *Jatropha curcas* from Eastern Uttar Pradesh. *Journal of Mycology and Plant Pathology*, 39:3.
- Kumar, R., Srivastava, S., Sinha, A., Sarma, B.K., y Kamil, D. (2012). First report of *Alternaria alternata* causing fruit rot disease of *Jatropha curcas* from India. Short communication. *Journal of Mycology and Plant Pathology*, 42, (2).
- Latha, P., Prakasam, V., Kamalakannan, A., Gopalakrishnan, C., Raguchander, T., Paramathma, M., y Samiyappan, R. (2009). First report of *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl causing root and collar rot disease of physic nut (*Jatropha curcas* L.) in India. *Australasian Plant Disease Notes*, 4: 19–21.

- McCartney, H. A., Foster, S. J., Fraaije, B. A., y Ward, E. (2003). Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. *Pest Management Science*, 59: 129–142.
- Narayanasamy, P. (2011). Microbial plant pathogens-detection and disease diagnosis. *Fungal Pathogens*, (1): 291 pp.
- Pereira, O. L., Dutra, D. C., y Dias, L. A. S. (2009). *Lasiodiplodia theobromae* is the causal agent of a damaging root and collar rot disease on the biofuel plant *Jatropha curcas* in Brazil. *Australasian Plant Disease Notes*, 4: 120–123.
- Peres, N. A. R., Timmer, L. W., Adaskaveg, J. E., y Correll, J. C. (2005). Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. *Plant Diseases*, 89: 784-796.
- Photita, W., Taylor, P. W. J., Ford, R., Hyde, K. D., y Lumyong, S. (2005). Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* species from herbaceous plants in Thailand. *Fungal Diversity*, 18, 117–133.
- Pryor, B. M. y Michailides, T. J. (2002). Morphological, Pathogenic, and Molecular Characterization of *Alternaria* Isolates associated with Alternaria Late Blight of Pistachio. *Phytopathology*, 92: 406-416.
- Qi, Y.-X., Pu, J.-J., Zhang, X., Zhang, H., Lu, Y., Yu, Q.-F., Zhang, H.-Q., y Xie, Y.-X. (2013). First Report of Dieback of Mango Caused by *Fusarium decemcellulare* in China. *Journal of Phytopathology*. Short communication.
- Rampersad, S. N. (2011). Molecular and phenotypic characterization of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease of papaya in Trinidad. *Plant Disease*, 95, 1244–1254.
- Sá, D. A. C., Santos, G. R., Furtado, G. Q., Erasmo, E. A. L, y Nascimento, I. R. (2011). Transporte, patogenicidade e transmissibilidade de fungos associados às sementes de pinhão manso. *Revista Brasileira de Sementes*, 33 (4): 663-670.

- Sangeetha, G., Anandan, A., y Usha Rani, S. (2012). Morphological and molecular characterisation of *Lasiodiplodia theobromae* from various banana cultivars causing crown rot disease in fruits, *Archives Of Phytopathology and Plant Protection*, 45 (4): 475-486.
- Santos, G. R., Tozze, J. H, J., Sá, D. A. C., Furtado, G. Q., y Massola J. N. S. (2013). Etiology and pathogenicity of two different isolates of *Colletotrichum* spp. obtained from physic nut seeds. *Journal of Seed Science*, 35 (2): 139-146.
- Shah, M. D., Verma, K. S., Singh, K., y Kaur, R. (2010). Morphological, pathological and molecular variability in *Botryodiplodia theobromae* (Botryosphaeriaceae) isolates associated with die-back and bark canker of pear trees in Punjab, India. *Genetics and Molecular Research*, 9 (2): 1217-1228.
- Shahnazi, S., Meon, S., Vadamalai, G., Ahmad, K. y Nejat, N. (2012). Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. associated with yellowing disease of black pepper (*Piper nigrum* L.) in Malaysia. *Journal of General Plant Pathology*, 78: 160–169
- Sharma, S., Kaushik, J. C., y Kaushik, N. (2001). *Fusarium moniliforme* causing root rot of *Jatropha*. *Indian Phytopathology*, 54: 275.
- Sulaiman, R., Thanarajoo, S. S., Kadir, J., y Vadamalai, G (2012). First Report of *Lasiodiplodia theobromae* Causing Stem Canker of *Jatropha curcas* in Malaysia. The American Phytopathological Society. *Plant Diseases*, 96, 5.
- Suryanarayana V. (2010) Studies on seed borne nature of anthracnose and *Cylindrocladium* white mold in *Jatropha curcas* L. Karnataka. *Journal of Agricultural Sciences*, 23: 809–810.
- Sutthisa, W., Sanoamuang, N., y Chuprayoon, S. (2010). Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp., the fungi associated with mulberry root rot disease in north-eastern Thailand. *Thai journal of botany*, 2(1): 25-39.

- Sutton, B. C. (1992). The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. in: *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. J. A. Bailey and J. J. Jeger, eds. CAB International, Wallingford, UK. 1-26.
- Torres-Calzada, C., Tapia-Tussell, R., Higuera-Ciapara, I. y Perez-Brito, D. (2012). Morphological, pathological and genetic diversity of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose in papaya (*Carica papaya* L). *European Journal of Plant Pathology*.
- Torres-Calzada, C., Tapia-Tussell, R., Nexticapan-Garcez, A., Matin-Mex, R., Quijano-Ramayo, A., Cortés-Velázquez, A., Higuera-Ciapara, I. y Perez-Brito, D. (2011). First report of *Colletotrichum capsici* causing anthracnose in *Jatropha curcas* in Yucatan, Mexico. *New Disease Reports*, 23 (6).
- Watanabe, T. (2002). Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species. 2nd Ed., CRC Press, New York, 486 pp.
- Wu, Y.-k., Ou, G.-t., y Yu, J.-Y. (2011). First report of *Nectria haematococca* causing root rot disease of physic nut (*Jatropha curcas*) in China. *Australasian Plant Diseases Notes*, 6:39–42.
- Zarafi, A. B. y Abdulkadir, I. D. (2012). Identification and host range of causal agent of dieback disease on *Jatropha curcas*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 45 (9): 1096-1100.
- Zarafi, A. B. y Abdulkadir, I. D. (2013). The incidence and severity of *Jatropha* dieback disease in Zaria, Nigeria. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 46 (8): 952-961.

CAPÍTULO III. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS HONGOS ASOCIADOS A *J. curcas*.

3.1 INTRODUCCIÓN

Actualmente el proceso de identificación de hongos no solamente se basa en sus características morfológicas, ya que los avances tecnológicos basados en el ADN, como las técnicas fundamentadas en la PCR, permiten la identificación más certera de los patógenos de las plantas y de hecho se están utilizando en conjunto con los métodos tradicionales para una identificación polifásica. En sí, los métodos tradicionales de identificación de patógenos de las plantas pueden ser laboriosos y tardados, además de que suelen requerir de un considerable conocimiento en taxonomía. Una de las limitaciones de estos métodos es la dificultad de cultivar algunas especies *in vitro*, y la incapacidad para cuantificar con precisión el patógeno (Goud y Termorshuizen, 2003), esto llevó a la búsqueda de técnicas de diagnóstico alternativas y ha conducido al desarrollo de métodos moleculares que tienen una mayor precisión y fiabilidad (Capote *et al.*, 2012).

Las técnicas moleculares generalmente se basan en las propiedades inherentes de los patógenos, tales como su genoma o la inmunorreactividad de sus proteínas; con la ventaja de que la identidad del organismo puede establecerse en las primeras etapas de su desarrollo, sin la necesidad de la formación de esporas sexuales o asexuales. Otra de sus ventajas, es que no depende de los síntomas inducidos por el patógeno en las plantas infectadas, lo cual es de gran relevancia si se tiene en consideración que existen plantas asintomáticas. Además este tipo de técnicas nos puede indicar la presencia o ausencia de un organismo patógeno y por si fuera poco, también nos puede indicar la cantidad del mismo en las muestras infectadas (Narayanasamy, 2011). Debido a su alto grado de especificidad, pueden utilizarse para distinguir organismos estrechamente relacionados (Capote *et al.*, 2012), y para detectar varios patógenos de un mismo cultivo simultáneamente, así como para distinguir entre razas o cepas de una misma especie (McCartney *et al.*, 2003). También se han aplicado al estudio de la variabilidad genética de las poblaciones de patógenos, e incluso para la descripción de nuevas especies de hongos (Capote *et al.*, 2012).

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Extracción del ADN genómico

La obtención del ADN se realizó a partir de micelio de aproximadamente 6 días de edad, de acuerdo al protocolo reportado por Tapia-Tussell *et al.*, (2006).

Se tomó 1 mg de micelio congelado de cada aislado fungoso y se depositó en un tubo eppendorf de 2 ml. Se añadieron 1000 μ l de buffer de extracción SDS, se incubaron a 65 °C durante 30 minutos con inversión ocasional y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron 600 μ l de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y los tubos se agitaron durante 10 minutos, se centrifugaron a 13,000 rpm por 10 minutos y el sobrenadante se transfirió a tubos limpios de microcentrífuga de 1.7 ml. Se adicionaron 700 μ l de isopropanol frío a cada tubo, se agitaron suavemente para mezclar las fases y las muestras se incubaron a -20 °C por 10 minutos, luego se volvió a centrifugar a 13,000 rpm y se eliminó el sobrenadante. Las pastillas se lavaron con 500 μ l de etanol al 70% y se centrifugaron por 5 minutos a 13,000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se secó a temperatura ambiente. Finalmente el ADN se resuspendió en 50 μ l de agua bidestilada estéril.

Se cuantificó la cantidad de ADN de acuerdo al método descrito por Sambrook *et al.*, (2000), este método se basa en la lectura que se obtiene a una longitud de onda de 260 nm, lo cual permite el cálculo de la concentración de ácidos nucleicos en la muestra. La concentración y la pureza del ADN (A_{260}/A_{280}) extraído se determinaron mediante un biofotómetro eppendorf.

Para determinar la calidad e integridad de ADN se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% en buffer TBE (tris-borato-EDTA) a 90V por 30 minutos. Los geles se tificaron previamente con bromuro de etidio (10mg/mL) y se visualizaron en un transiluminador UV, se capturaron las imágenes y se analizaron.

3.2.2 Identificación con iniciadores específicos

La identificación molecular de *Colletotrichum gloeosporioides* se realizó utilizando el iniciador específico CgInt (5'- GGCCTCCCGCCTCCGGGCGG -3') en conjunto con el iniciador universal ITS4 (Talhinhas *et al.*, 2002; Mills *et al.*, 1992). Las reacciones de PCR se llevaron a un volumen final de 25 μ l, que contuvo 25 ng de ADN, 1X de amortiguador (10X: 200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8,4) (Invitrogen), 0.20 mM de cada dNTP (Invitrogen), 1.5 mM de MgCl₂, 1 μ M de iniciador y 1 U de Taq polimerasa (Invitrogen).

La amplificación consistió de una etapa inicial de desnaturalización a 95 °C por 5 minutos, seguido por 25 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 2 min a 62 °C y 2 min a 72 °C, y un paso final de extensión de 5 min a 72 °C. Los productos de PCR de aproximadamente 450 pb se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% (p/v) y se tñeron con bromuro de etidio.

3.2.3 Secuenciación

3.2.3.1 Amplificación de la región de ITS y el gen 5.8S

Para la amplificación de la región ITS completa (ITS1, ITS2) y el gen 5.8S del ADNr de todos los aislados, se usaron los iniciadores universales ITS1 (5'- TTC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e ITS4 (5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'), descritos por White *et al.*, (1990).

La reacción de PCR se llevó a un volumen final de 25 μ l, que contuvo 1X de amortiguador (10X: 200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.4) (Promega), 0.20 mM de cada dNTP (Invitrogen), 2.50 mM MgCl₂ (Promega), 1 pmol de cada iniciador, 1.25 U de Go Taq Flexi DNA polimerasa (Promega) y 100 ng de ADN objetivo. La amplificación consistió en un primer paso de amplificación a 95 °C por 1 minuto, seguido por 30 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 58 °C (temperatura de alineamiento) y 1 minuto a 72 °C, y un paso final de extensión de 7 minutos a 72 °C. El producto de amplificación obtenido se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa (Invitrogen) a 1.5% (p/v) en amortiguador TBE 1X (Tris-Borato-EDTA), a 100V por 50 minutos. Los geles se tñeron previamente con bromuro de etidio y se utilizó como marcador de peso molecular la escalera de 100 pb.

Los productos de amplificación de la región ITS fueron enviados al laboratorio de secuenciación Macrogen Inc (Corea), en la cantidad especificada por el laboratorio. Posteriormente las secuencias obtenidas fueron procesadas con el programa BioEdit Sequence Alignment (Hall, 1999) y se comparó con la base de datos del GenBank.

3.2.4 Caracterización molecular

3.2.4.1 PCR-RFLP

Los productos amplificados de la región ITS1/ITS2 y el gen 5.8S de todos los aislados fueron digeridos con las enzimas de restricción *AluI*, *HaeIII*, *HindIII*, *MspI*, *RsaI*, y *TaqI*. La reacción de digestión se llevó en un volumen de reacción de 20 μ L que contuvo 10 μ L del ADN amplificado, 2 μ L del buffer 10X de la enzima de restricción, 0.2 μ L de BSA al 0.1%, 0.2 μ L de la enzima y 7.6 μ L de agua destilada estéril. Las reacciones de digestión fueron incubadas a 37 °C por 2 h para las enzimas *AluI*, *HaeIII*, *HindIII*, *MseI*, *MspI*, *RsaI*, y a 70 °C por 2 h para la enzima *TaqI*.

Los productos de digestión se separaron en un gel de agarosa al 2%, se usó el buffer de corrida TBE 1X y se tiñó con bromuro de etidio. Los patrones de digestión se visualizaron bajo un transiluminador UV y las imágenes fueron tomadas con el programa Sistema BioImaging UVP.

3.2.4.2 AP-PCR

Para los análisis de AP-PCR se utilizaron 6 iniciadores de 15 pares de bases: (GTG)₅, (GACAC)₃, (CAG)₅, (GAC)₅, (TCC)₅ y MR. (Torres-Calzada *et al.*, 2012; Nguyen *et al.*, 2009). La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 μ L que contuvo 1X de amortiguador (10X: 200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.4) (Invitrogen), 0.25 mM de cada dNTP, 2 mM de MgCl₂, 0.8 μ M de iniciador y 1U de *Taq* polimerasa (Invitrogen).

La amplificación consistió de un primer paso de desnaturalización a 95 °C por 5 minutos, seguido por 40 ciclos de: desnaturalización durante 40 segundos a 95 °C, alineamiento durante 1 min a 42 °C para (GACAC)₃ y (TCC)₅, o 50 °C para (GTG)₅, (GAC)₅ y M13 o 60 °C para (CAG)₅, extensión durante 1 min a 72 °C; y un paso de extensión final de 5 min a 72 °C. Los productos de PCR amplificados se visualizaron mediante electroforesis en

geles de poliacrilamida al 6% en una proporción 29:1 (acrilamida: bisacrilamida) (ver anexo 1). Los geles fueron corridos a un voltaje constante de 100 V por 4 horas en amortiguador Tris-Glicina (TG) 1X. El revelado se realizó mediante la técnica de tinción de plata (ver anexo 2 y 3).

3.2.5 Análisis filogenético

Las bandas obtenidas por la técnica AP-PCR fueron registradas como presencia (=1) o ausencia (=0) y se generó una matriz binaria para cada iniciador. Los datos de las matrices de cada iniciador se combinaron y se utilizó el programa NTSYSpc v. 2.1 (Rohlf, 2000) para crear una matriz de similitud con el coeficiente de Jaccard (número de bandas comunes/ número total de bandas de los dos aislados que se comparan; Jaccard, 1901). Posteriormente se realizó un análisis de agrupamiento (cluster) con el método UPGMA y se generó un Dendograma (Anderson *et al.*, 2013). El soporte de las ramas en el árbol fue medido con un análisis de bootstrapping (Felsenstein, 1985) usando 1000 réplicas.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Identificación

Los aislados previamente identificados por sus características morfológicas como *Colletotrichum gloeosporioides*, fueron amplificados con los iniciadores específicos CgInt/ITS4. Como se puede observar en la figura 20, se obtuvo un producto de amplificación de aproximadamente 450 pb para todos los aislados, lo que indica que todos ellos corresponden a *C. gloeosporioides*, ya que este producto de amplificación coincide con lo reportado por Mills *et al.*, (1992) para la especie en cuestión.

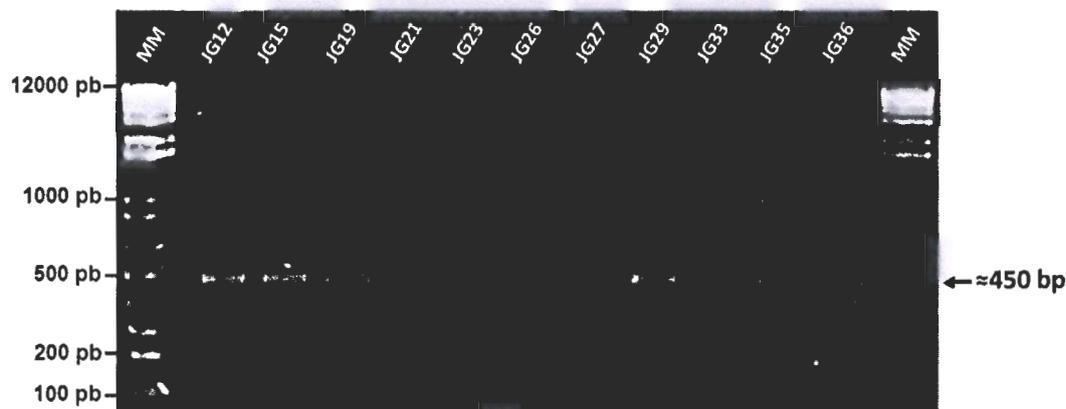


Figura 20. Productos de amplificación con el par de iniciadores CgInt/ITS4 para identificar a *Colletotrichum gloeosporioides*. MM: Marcador molecular 1 Kb plus.

En la figura 21 se muestra que el producto de amplificación de la región ITS de todas las muestras restantes (*Fusarium* sp., *Lasiodiplodia* sp. y *Alternaria* sp.) fue de aproximadamente 550 pb.

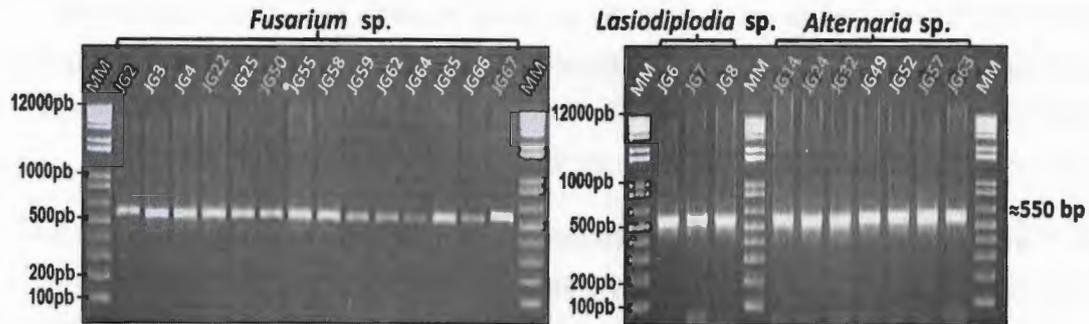


Figura 21. Productos de amplificación de la región ITS de *Fusarium sp.*, *Lasiodiplodia sp.*, y *Alternaria sp.* MM: Marcador molecular 1Kb plus.

Todos estos productos de amplificación se mandaron a secuenciar y el análisis de estas secuencias utilizando la base de datos del GenBank, permitió identificarlas a nivel de especie. En el cuadro 10 se presenta la especie a la cual corresponde cada aislado, el porcentaje de identidad y el número en el BankIt.

Cuadro 10. Aislados secuenciados en este estudio.

Clave de aislado	Especie	% identidad	No. BankIt
JG2	<i>Fusarium solani</i>	98	1697826
JG3	<i>Fusarium equiseti</i>	99	1697827
JG4	<i>Fusarium equiseti</i>	99	1697828
JG22	<i>Fusarium equiseti</i>	99	1697832
JG25	<i>Fusarium equiseti</i>	99	1697876
JG50	<i>Fusarium equiseti</i>	99	1697879
JG55	<i>Fusarium equiseti</i>	99	1697881
JG58	<i>Fusarium equiseti</i>	99	1697885
JG59	<i>Fusarium equiseti</i>	99	1697889
JG62	<i>Fusarium equiseti</i>	99	1697890
JG64	<i>Fusarium equiseti</i>	99	1697891
JG65	<i>Fusarium equiseti</i>	99	1697895
JG66	<i>Fusarium equiseti</i>	98	1697896
JG67	<i>Fusarium decemcellulare</i>	99	1697900
JG14	<i>Alternaria alternata</i>	100	1697786
JG24	<i>Alternaria alternata</i>	99	1697788
JG32	<i>Alternaria alternata</i>	99	1697794
JG49	<i>Alternaria alternata</i>	99	1697819
JG52	<i>Alternaria alternata</i>	99	1697820
JG57	<i>Alternaria alternata</i>	100	1697821
JG63	<i>Alternaria alternata</i>	99	1697822
JG6	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	99	1697903
JG7	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	100	1697905
JG8	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	99	1697908

Para corroborar la identidad de estos aislados, se tomaron varias secuencias del GenBank y se construyó un árbol filogenético por el método UPGMA. En la figura 22, se aprecia que se formaron dos grupos bien definidos (1 y 2), en el primero se ubicaron todas las cepas de *Alternaria alternata*, mientras que en el segundo se concentraron el resto de las cepas.

El clado 2 a su vez se subdividió en dos subclados (2A y 2B), en el primer subclado se agruparon todas las cepas correspondientes a *Lasiodiplodia theobromae*, mientras que en el segundo subclado se encontraron todas las cepas del género *Fusarium*. Dividiéndose éste último, en el subclado 2B1 donde se ubicaron todas las cepas de *Fusarium equiseti* y en el subclado 2B2, donde se encuentran dos grupos bien definidos representados por *Fusarium solani* y *Fusarium decemcellulare*. Todas las ramas tuvieron una alta robustez que confirma la correcta identidad de todas las cepas.

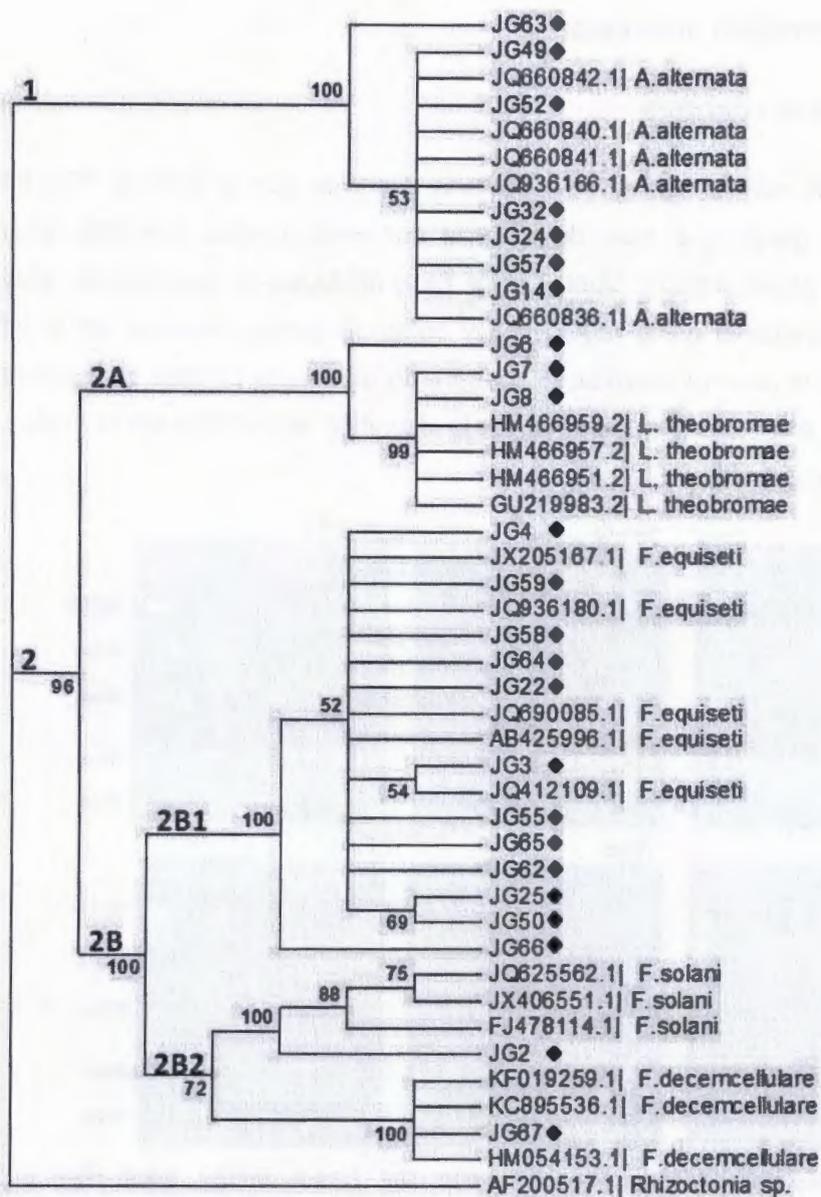


Figura 22. Árbol filogenético derivado del análisis UPGMA basado en la secuenciación de la región ITS del ADNr de los hongos bajo estudio. Como grupo externo se utilizó a *Rhizoctonia* sp. ◆ aislados bajo estudio.

3.3.2 Caracterización molecular

3.3.2.1 *Alternaria alternata*

El análisis de los siete aislados de *Alternaria alternata* con la técnica PCR-RFLP, no reveló variación genética a nivel de especie con esta técnica. Las seis enzimas de restricción (*AluI*, *HaeIII*, *HindIII*, *MspI*, *RsaI* y *TaqI*) utilizadas en este estudio encontraron sitios de reconocimiento en la región ITS y como se puede observar en la figura 23, dependiendo de la enzima utilizada, se generaron diferentes perfiles de restricción. Los tamaños de los fragmentos generados en la digestión enzimática de la región ITS se presentan en el cuadro 11.

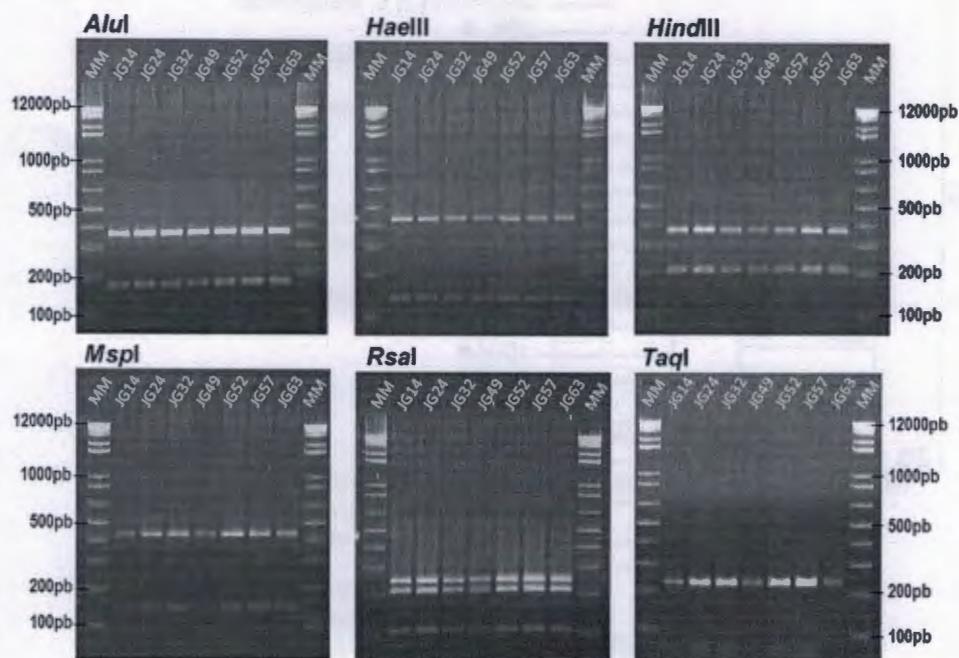


Figura 23. Perfiles de restricción generados con *AluI*, *HaeIII*, *HindIII*, *MspI*, *RsaI* y *TaqI* para *Alternaria alternata*. MM: Marcador molecular 1 Kb plus.

Cuadro 11. Longitud de los fragmentos de restricción obtenidos por PCR-RFLP para *Alternaria alternata*.

Clave de la cepa	Enzimas de restricción					
	<i>AluI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HindIII</i>	<i>MspI</i>	<i>RsaI</i>	<i>TaqI</i>
JG14, JG24, JG32,					250	225
JG49, JG52, JG57,	370	420	370	430	215	220
JG63	180	140	210	140	110	70
						60

Huella genética:

De los seis iniciadores utilizados, los que tuvieron un mayor poder resolutivo fueron MR, (TCC)₅ y (GACAC)₃ (Fig. 24).

Con el iniciador MR, el rango de polimorfismo estuvo entre 500 y 2000 pb. Con éste, fue posible distinguir entre todas las cepas, con excepción de JG14 y JG24, que mostraron un mismo patrón de bandas. Las cepas JG32 y JG49 tuvieron muchas bandas en común con este iniciador, sin embargo se pudo observar una banda de 650 pb en JG32 que la diferenció de JG49. La cepa JG52 mostró el mayor número de bandas polimórficas en la zona de 810 a 980 pb. Mientras que la cepa JG57 presentó una banda distintiva de 1800 pb. Por su parte la cepa JG63 presentó bandas de 1400 y 1650 pb que la diferencian del resto.

El iniciador (TCC)₅ reveló diferencias entre las cepas JG14 y JG24, en la zona de 600 a 1000 pb, también el iniciador (GACAC)₃ marcó esta diferencia en el rango de 500 a 850 pb, lo que indica que se trata de dos cepas diferentes. Con ambos iniciadores se pudo observar, que las cinco muestras restantes tienen patrones únicos. Con el iniciador (TCC)₅ la zona de polimorfismo para todas las cepas estuvo entre 910 y 1100 pb, mientras que con el iniciador (GACAC)₃ esta zona polimórfica se encontró entre los 575 y 1000 pb. Con este último iniciador también se pudo observar que todas las cepas comparten una banda común de aproximadamente 1440 pb.

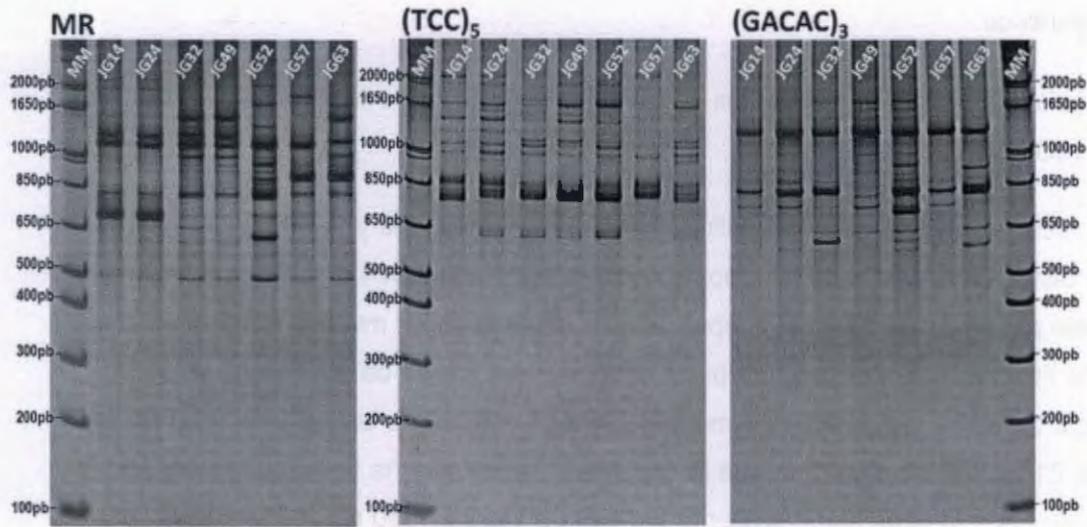


Figura 24. Perfiles de bandas de *Alternaria alternata* obtenidas con los iniciadores MR, $(TCC)_5$ y $(GACAC)_3$. MM: marcador molecular 1Kb plus.

El análisis a nivel de ADN genómico utilizando la técnica AP-PCR reveló alto grado de polimorfismo intraespecífico; dependiendo del iniciador y de la cepa se obtuvieron diferentes patrones de bandas para esta especie (Cuadro 12), por lo que se pudo constatar que cada cepa es un individuo diferente.

Cuadro 12. Patrón de huellas genéticas obtenidas por AP-PCR para las cepas de *Alternaria alternata*.

Clave de la cepa	Iniciadores					MR	Patrón general
	$(CAG)_5$	$(GAC)_5$	$(GACAC)_3$	$(GTG)_5$	$(TCC)_5$		
JG14	A	A	A	A	A	A	A
JG24	B	B	B	B	B	A	B
JG32	C	C	C	C	C	B	C
JG49	D	D	D	D	D	C	D
JG52	E	E	E	E	E	D	E
JG57	F	F	F	F	F	E	F
JG63	G	G	G	G	G	F	G

Con los datos de AP-PCR se generó un dendograma para conocer las relaciones entre las distintas cepas (Fig. 25). En éste se puede observar que se formaron dos grupos bien definidos cuando el coeficiente de similaridad fue de 0.42. En el grupo 1 se concentraron las cepas de Sur del Estado (JG14 y JG24), mientras que en el grupo 2 el resto de las cepas. Este grupo a la vez se subdividió en dos clados (2A y 2B). En el primero se agruparon todas las cepas de Mérida (JG32, JG49, JG52) y en el segundo las de Opichén (JG57, y JG63). Las cepas JG32 y JG49 fueron las más cercanas entre sí, con un coeficiente de similitud de 0.71.

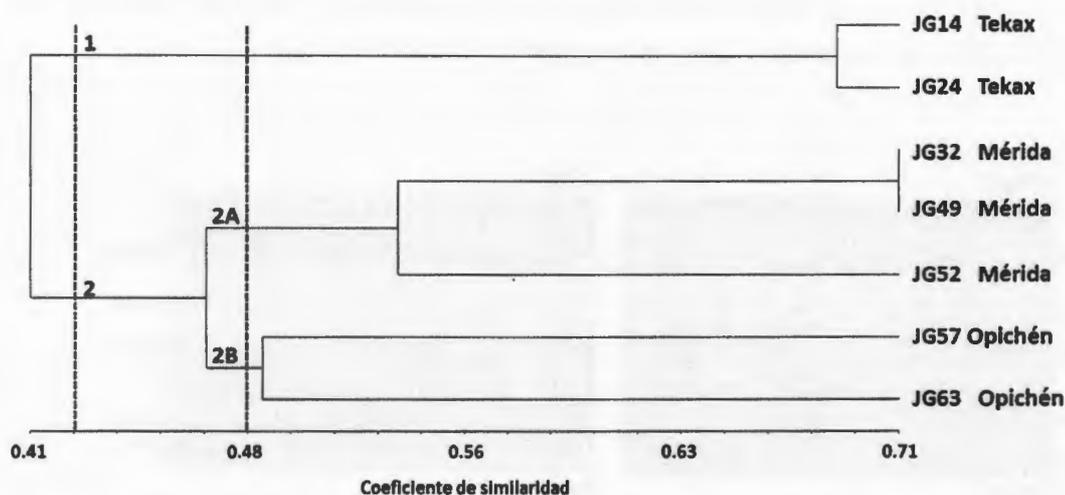


Figura 25. Dendograma obtenido por UPGMA, basado en el análisis de los datos de todos los iniciadores con los aislados de *Alternaria alternata*.

3.3.2.2 *Fusarium* sp.

El análisis por PCR-RFLP de la región ITS de las catorce cepas de *Fusarium* indicó variación genética de especie a especie, pero no dentro de la misma especie. De manera general, las enzimas *Hind*III y *Rsa*I no encontraron sitio de reconocimiento en ninguna de las especies de *Fusarium* aquí estudiadas (*F. solani*, *F. equiseti* y *F. decemcellulare*). En la figura 26, se pueden observar los diferentes perfiles de restricción generados con las

cuatro enzimas restantes. La enzima *MspI* no fue capaz de digerir las cepas de *F. equiseti* (JG3-JG66) pero sí a *F. solani* (JG2) y *F. decemcellulare* (JG67), para las cuales generó diferentes perfiles de restricción.

Con la enzima *AluI* las cepas JG2 (*F. solani*) y JG67 (*F. decemcellulare*) tuvieron perfiles de restricción muy similares entre ellas y a su vez diferentes del resto de las cepas (*F. equiseti*). Únicamente las enzimas *MspI*, *HaeIII* y *TaqI*, permitieron diferenciar a estas tres especies, ya que generaron perfiles de bandas únicas para ellas. De estas enzimas mencionadas, la más indicada para estudios de identificación de las especies de *Fusarium* bajo estudio, es la *HaeIII* ya que los perfiles de restricción para cada especie son contrastantes. Los tamaños de los fragmentos generados en la digestión enzimática para cada una de las cepas de *Fusarium* se muestran en el cuadro 13.

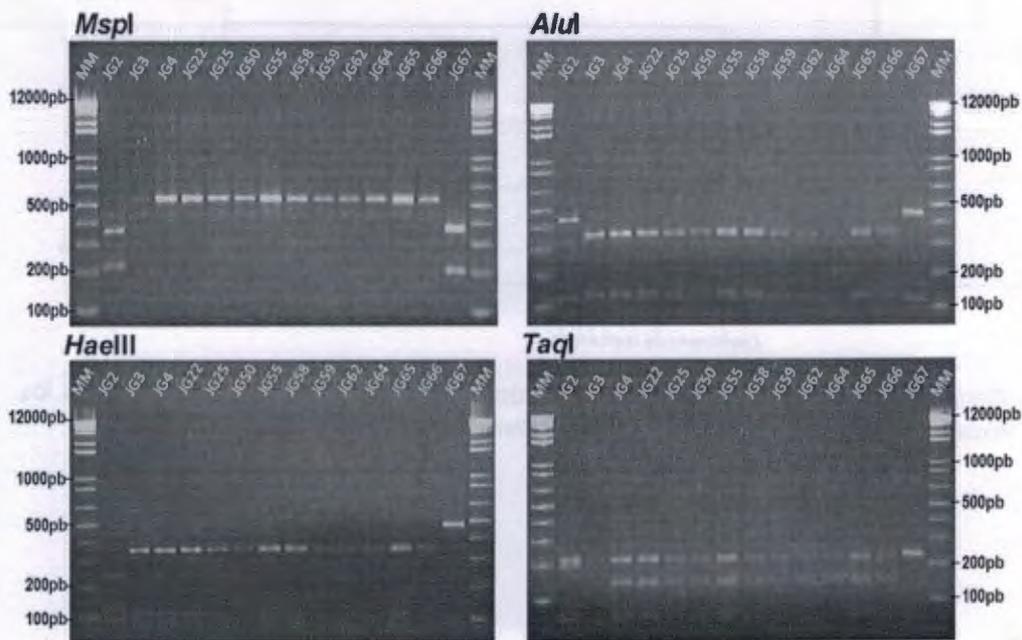


Figura 26. Perfiles de restricción generados con las enzimas *MspI*, *AluI*, *MspI* y *TaqI* para *Fusarium solani* (JG2), *Fusarium equiseti* (JG3-JG66) y *Fusarium decemcellulare* (JG67). MM: Marcador molecular 1 kb plus.

Cuadro 13. Longitud de los fragmentos de restricción obtenidos por PCR-RFLP para *Fusarium solani*, *Fusarium equiseti* y *Fusarium decemcellulare*.

Clave de la cepa	Enzimas de restricción					
	<i>AluI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HindIII</i>	<i>MspI</i>	<i>RsaI</i>	<i>TaqI</i>
JG2		240				230
	440	125	Nd	370	Nd	200
	120	95		220		60
		90				55
JG3, JG4, JG22, JG25, JG50, JG55, JG58, JG59, JG62, JG64, JG65, JG66	370	360	Nd	Nd	Nd	230
	140	115				160
	50	90				80
						75
JG67	470	480	Nd	370	Nd	235
	130	90		200		230
						75
						70

Nd: No digerido

Huella genética:

De los seis iniciadores utilizados (GACAC)₃ y MR fueron los más resolutivos para las especies de *Fusarium* en este estudio. El rango de polimorfismo de todas las cepas con estos dos iniciadores fue de 300 a 1600 pb (Fig. 27). Con el iniciador (GACAC)₃, *F. solani* (JG2) presentó bandas distintivas de 320, 370 y 415 que la diferencia de las otras dos especies, mientras que en *F. decemcellulare* (JG67) se observó una zona polimórfica entre 560 y 670 pb. En cuanto a *F. equiseti* (JG3- JG66), las cepas tuvieron una banda en común de aproximadamente 400 pb, que no estuvo presente ni en *F. solani* (JG2) ni en *F. decemcellulare* (JG67).

Con el iniciador MR se pudo observar que todas las cepas presentaron una banda de aproximadamente 600 pb. *F. solani* se distinguió por las bandas de 900, 980, 1300 y 1400 pb, mientras que *F. decemcellulare* presentó bandas distintivas en la zona de 1000 a 1650 pb. Para las cepas de *F. equiseti* las bandas de 1200 y 1600 pb son comunes. Es preciso indicar que con ambos iniciadores las cepas JG25-JG50 y JG58-JG59, tienen muchas bandas en común, sin embargo también existen regiones que permiten diferenciarlas; por ejemplo para JG25 y JG50 se presenta polimorfismo en la zona de 650 a 850 pb con ambos iniciadores, mientras que las cepas JG58 y JG59, se distinguen por

presentar polimorfismo en el rango de 500 a 1650pb con $(GACAC)_3$ y 400 a 1650 pb con el iniciador MR.

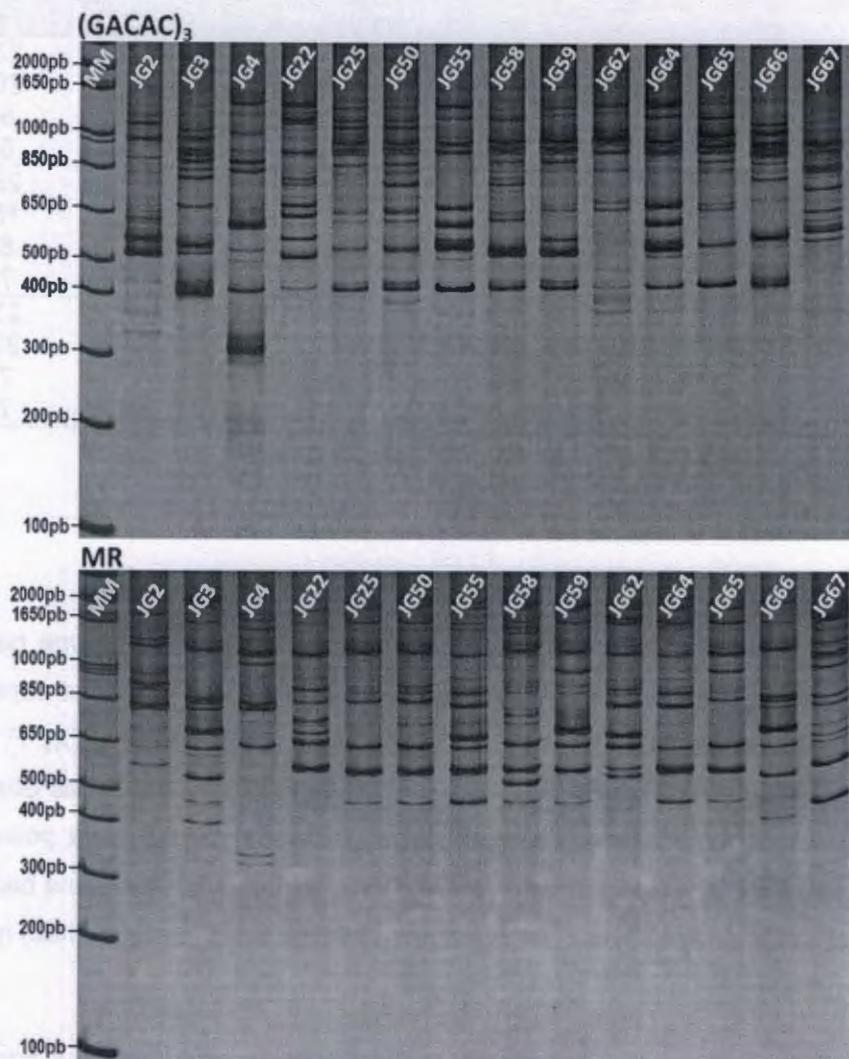


Figura 27. Patrones de bandas de las especies de *Fusarium* obtenidos con los iniciadores $(GACAC)_3$ y MR. MM: Marcador molecular 1Kb plus. JG2: *Fusarium solani*; JG3-JG66: *Fusarium equiseti* y JG67: *Fusarium decemcellulare*.

Los patrones de bandas generados con todos los iniciadores se muestran en el cuadro 14. En el patrón general de las huellas genéticas existió una gran diversidad intraespecífica para las cepas de *Fusarium equiseti*. Los iniciadores $(CAG)_5$, $(GAC)_5$,

(GTG)₅ y (TCC)₅ indicaron que JG25 y JG50 comparten un mismo perfil de bandas, mientras que con los demás iniciadores arrojaron un perfil único para cada cepa, lo que ratificó que se trataba de dos cepas diferentes.

Cuadro 14. Patrón de huellas genéticas obtenidas por AP-PCR para las cepas de *Fusarium* sp.

Clave de la cepa	Iniciadores					MR	Patrón general
	(CAG) ₅	(GAC) ₅	(GACAC) ₃	(GTG) ₅	(TCC) ₅		
JG2	A	A	A	A	A	A	A
JG3	B	B	B	B	B	B	B
JG4	C	C	C	C	C	C	C
JG22	D	D	D	D	D	D	D
JG25	E	E	E	E	E	E	E
JG50	E	E	F	E	E	F	F
JG55	F	F	G	F	F	G	G
JG58	G	G	H	G	G	H	H
JG59	H	H	I	H	H	I	I
JG62	I	I	J	I	I	J	J
JG64	J	J	K	J	J	K	K
JG65	K	K	L	K	K	L	L
JG66	L	L	M	L	L	M	M
JG67	M	M	N	M	M	N	N

Con los datos de AP-PCR se generó un dendograma para conocer las relaciones entre las distintas cepas de *Fusarium*. En la figura 28 se puede observar el dendograma con tres grupos bien definidos (1, 2 y 3), los cuales están de acuerdo a la especie a la cual pertenecen. En el grupo 1 se ubicó a *Fusarium solani* (JG2), mientras que en el grupo 2 se encontró a todas las cepas de *Fusarium equiseti* (JG3-JG66) y finalmente en el grupo 3 se ubicó *Fusarium decemcellulare* (JG67).

El grupo 2 (*F. equiseti*) a su vez se subdividió en cuatro subgrupos (2A, 2B, 2C y 2D). En el subgrupo 2A se agruparon las cepas JG3 y JG66, que fueron aisladas del ápice de tallo y de la hoja respectivamente, en las localidades de Tizimín y Opichén. En el subgrupo 2B únicamente se ubicó a la cepa JG3, aislada de fruto de la localidad de Tekax.

Mientras que en el subgrupo 2C, se encontraron a la mayoría de las cepas, este subgrupo a su vez, se subdividió formando los clados 2C1 y 2C2. En el clado 2C1 se

agruparon las cepas JG25, JG50, JG58 y JG59. Cabe destacar que las cepas JG25 y JG50 se encuentran estrechamente relacionadas entre sí, con un coeficiente de similitud de 0.87. Coincidentemente, estas cepas fueron aisladas del ápice del tallo de las plantas ubicadas en la localidad de Tekax, mientras que las cepas JG58 y JG59 de hojas de plantas de Opichén. En el clado 2C2 se agruparon las cepas JG55, JG62 y JG64, las dos últimas, se encuentran más cercanas entre sí, con un coeficiente de similitud de 0.38. Ambas cepas fueron aisladas de hojas en la localidad de Opichén, mientras que la cepa JG55 también fue aislada de tejido foliar, pero de la localidad de Mérida. Finalmente en el subgrupo 2D únicamente se ubicó la cepa JG65, la cual fue aislada de hoja de plantas de Opichén.

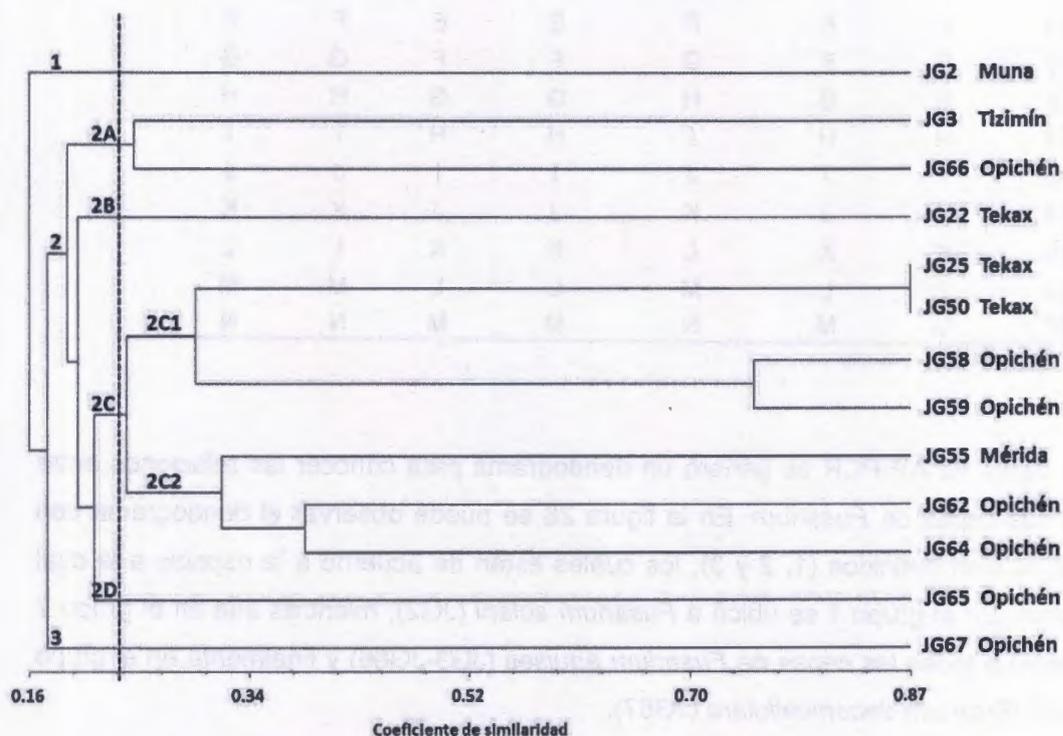


Figura 28. Dendrograma obtenido por UPGMA, basado en el análisis de los datos de todos los iniciadores con los aislados de *Fusarium*.

3.3.2.3 *Lasiodiplodia theobromae*

El análisis de los tres aislados de *Lasiodiplodia theobromae* con las seis enzimas de restricción, indicó que las enzimas *AluI*, *HaeIII*, *MspI*, *RsaI* y *TaqI* encontraron sitios de restricción en la región ITS de esta especie, pero ninguna de ellas fue capaz de mostrar variación genética a nivel de especie (Fig. 29). La enzima *HindIII* fue la única que no encontró sitio de restricción en esta región amplificada. Los tamaños de los fragmentos de la digestión de la región ITS de estas cepas se presentan en el cuadro 15.

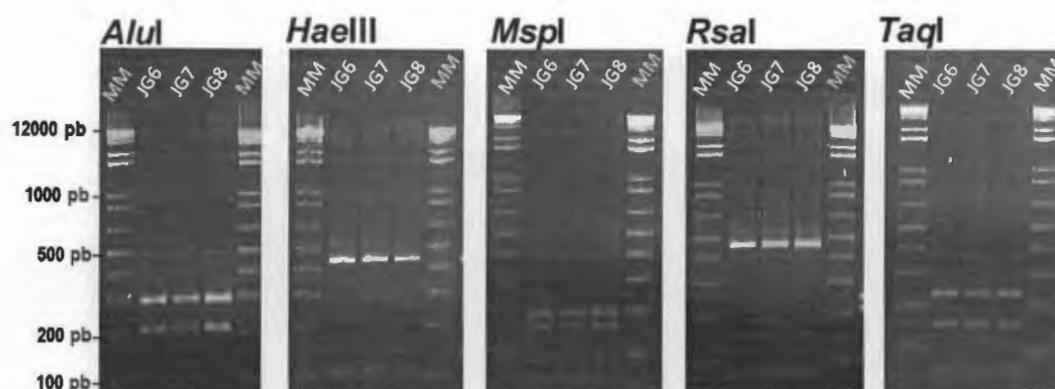


Figura 29. Perfiles de restricción generados con las enzimas *AluI*, *HaeIII*, *MspI*, *RsaI* y *TaqI* para *Lasiodiplodia theobromae*. MM: Marcador molecular 1 kb plus.

Cuadro 15. Longitud de los fragmentos de restricción obtenidos por PCR-RFLP para *Lasiodiplodia theobromae*.

Especie	Enzimas de restricción					
	<i>AluI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HindIII</i>	<i>MspI</i>	<i>RsaI</i>	<i>TaqI</i>
JG6, JG7, JG8				200		
	290	440	Nd	170	470	230
	210	110		90	90	150
				70		75

Nd: No digerido

En el análisis del ADN genómico con la técnica AP-PCR de esta especie, no se observó mucho polimorfismo entre las cepas bajo estudio, lo que indica la poca variabilidad de *Lasiodiplodia theobromae* (Fig. 30). El iniciador (CAG)₅ fue el único que generó tres perfiles de bandas, que permitieron diferenciar a las tres cepas de *Lasiodiplodia*

theobromae, por lo que puede considerarse como el iniciador más idóneo para distinguir entre cepas de esta especie. En la figura 30 la zona polimórfica para las 3 cepas bajo estudio se concentró entre 650 y 2000 pb. Con el iniciador (GTG)₅ se encontró que las cepas JG6, JG7 y JG8 comparten un perfil de bandas muy similar, sin embargo para JG8 no se observa la banda de 470 pb. Con el iniciador MR se observó que la cepa JG8 se diferencia de las dos cepas anteriores, por la presencia de las bandas distintivas a 515, 680 y 820 pb. Mientras que con los demás iniciadores únicamente se observaron perfiles monomórficos.

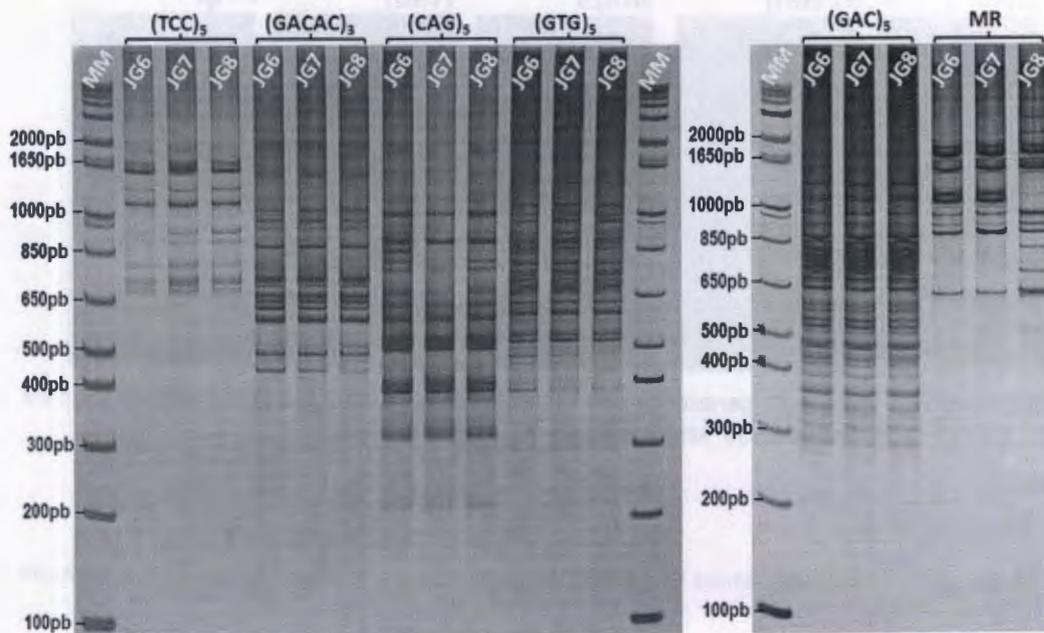


Figura 30. Patrones de bandas de *Lasiodiplodia theobromae* con todos los iniciadores. MM: Marcador molecular 1Kb plus.

Los perfiles obtenidos con los diferentes iniciadores se presentan en el cuadro 16. El iniciador (CAG)₅, fue el único que mostró polimorfismo entre las cepas de *Lasiodiplodia theobromae*, los iniciadores (GTG)₅ y MR generaron dos perfiles de bandas, mostrando que JG6 y JG7 se encuentran estrechamente relacionadas.

Cuadro 16. Patrón de huellas genéticas obtenidas por AP-PCR para las cepas de *Lasiodiplodia theobromae*.

Clave de la cepa	Iniciadores					MR	Patrón general
	(CAG) ₅	(GAC) ₅	(GACAC) ₃	(GTG) ₅	(TCC) ₅		
JG6	A	A	A	A	A	A	A
JG7	B	A	A	A	A	A	B
JG8	C	A	A	B	A	B	C

Los datos recabados de la presencia o ausencia de bandas con todos los iniciadores, permitieron generar el dendograma de la figura 31. En éste se presentan dos grupos bien definidos. Los agrupamientos de esta especie se formaron en función de la localidad de procedencia de las cepas. En el grupo 1 se encuentran JG6 y JG7 que proceden de la localidad de Tizimín, mientras que en el grupo 2 se encuentra la cepa JG8, proveniente de la localidad de Muna.

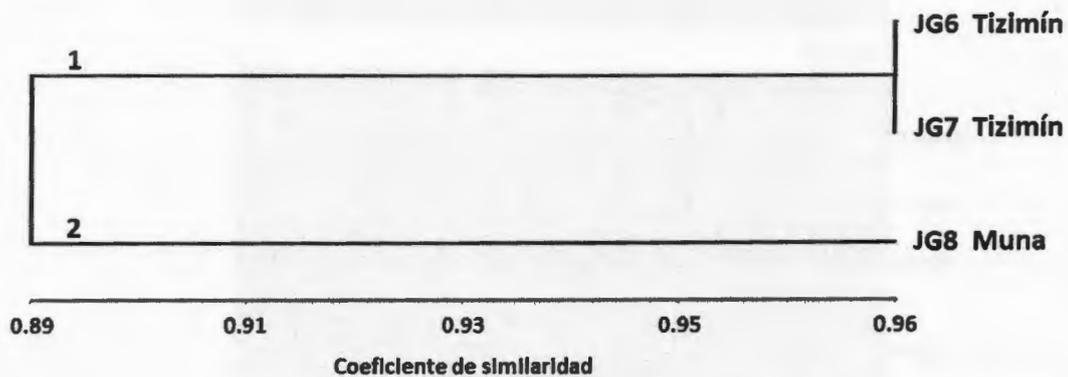


Figura 31. Dendograma obtenido por UPGMA, basado en el análisis de los datos de todos los iniciadores con los aislados de *Lasiodiplodia theobromae*.

3.3.2.4 *Colletotrichum gloeosporioides*

El análisis de las veinte cepas de *Colletotrichum gloeosporioides* con la técnica PCR-RFLP indicó que de las seis enzimas utilizadas, sólo *AluI*, *HaeIII*, *MspI*, *RsaI* y *TaqI* digirieron la región ITS de esta especie, pero en ninguna de ellas se observó variación genética a nivel de especie (Fig. 32). La longitud de los fragmentos de restricción de la región ITS de estas cepas, con todas las enzimas se muestra en el cuadro 17.

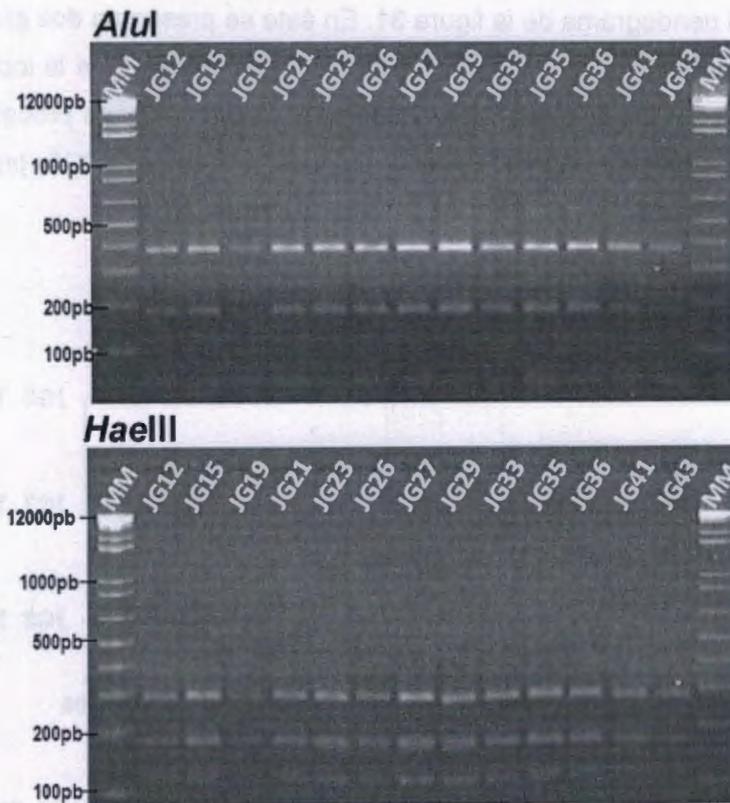


Figura 32. Perfiles de restricción generados con las enzimas *AluI* y *HaeIII* para *Colletotrichum gloeosporioides*. MM: Marcador molecular 1 Kb plus.

Cuadro 17. Longitud de los fragmentos de restricción obtenidos por PCR-RFLP para *Colletotrichum gloeosporioides*.

Clave de la cepa	Enzimas de restricción					
	<i>AluI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HindIII</i>	<i>MspI</i>	<i>RsaI</i>	<i>TaqI</i>
JG12, JG15, JG19, JG21, JG23, JG26, JG27, JG29, JG33, JG35, JG36, JG38, JG41, JG43, JG44, JG46, JG47, JG51, JG53, JG54	395 195	290 180 120	Nd	360 120 110	400 190	270 260 60

Nd: No digerido

El análisis del ADN genómico con los 6 iniciadores reveló un alto nivel de polimorfismo entre los aislados de *Colletotrichum gloeosporioides*. Con el iniciador (CAG)₅ se obtuvieron bandas en un rango de 200 a 1200 pb. En la figura 33 se muestra que las cepas JG35 y JG36 presentaron perfiles de bandas muy similares, aunque difieren en la zona de 650 a 850 pb. Con este mismo iniciador, las cepas JG46 y JG47 presentaron un mismo perfil de bandas, mientras que JG51, JG53 y JG54 comparten muchas bandas, pero difieren en la zona de 200 a 300 pb. Se pudo constatar que una banda de aproximadamente 1000 pb es distintiva para esta especie, pues se presentó en todas las cepas.

El iniciador MR, reveló la variabilidad genética que existe entre las 20 cepas y con él se apreció una banda de 850 pb que parece ser distintiva para la especie de *Colletotrichum gloeosporioides*. Con este iniciador las cepas JG35 y JG36 comparten el mismo perfil de bandas al igual que JG46 y JG47. Otras cepas que presentaron muchas bandas en común fueron JG51, JG53 y JG54, aunque se diferencian en la zona de 500 a 650 pb, indicando esto que son diferentes.

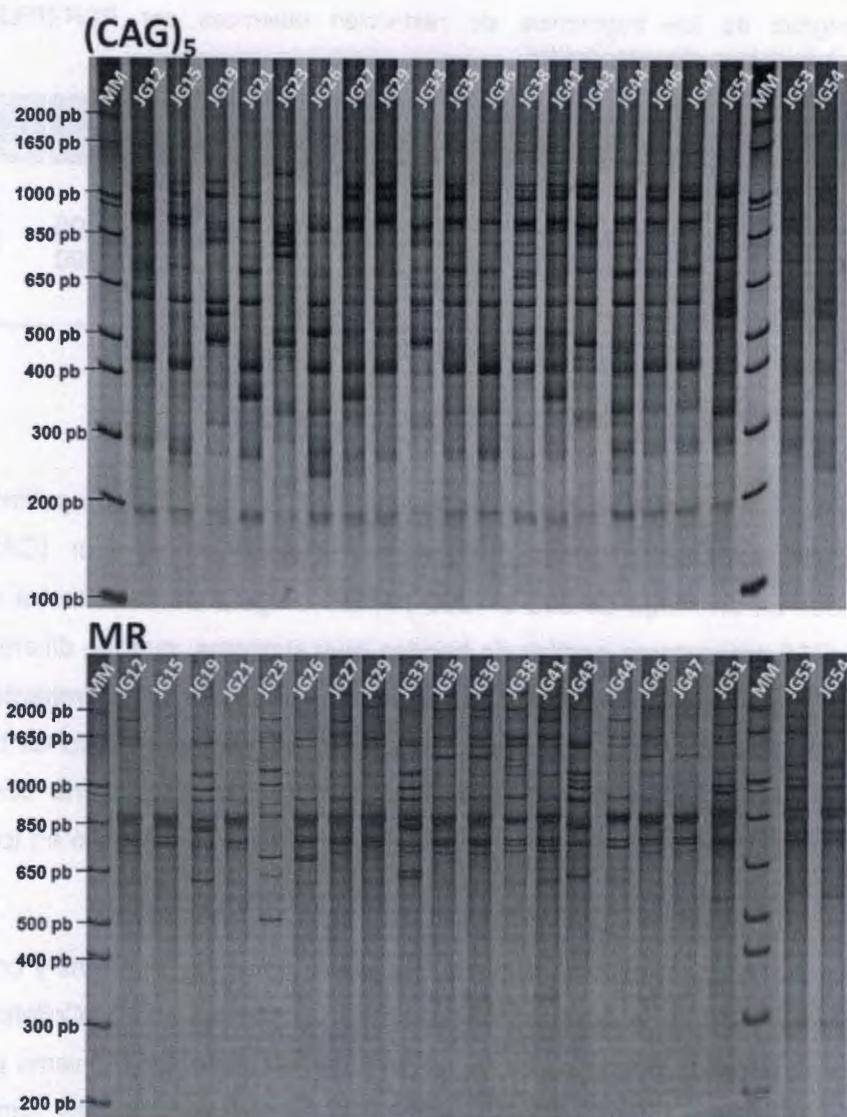


Figura 33. Patrones de bandas de *Colletotrichum gloeosporioides* obtenidos con el iniciador $(CAG)_5$ y MR. MM: marcador molecular 1Kb plus.

Los patrones de bandas generados con todos los iniciadores se muestran en el cuadro 18. En el patrón general de las huellas genéticas existió una gran diversidad intraespecífica para *Colletotrichum gloeosporioides*, además que se pudo constatar que cada cepa es un individuo diferente.

Cuadro 18. Patrón de huellas genéticas obtenidas por AP-PCR, para los aislados de *Colletotrichum gloeosporioides*.

Clave de la cepa	Iniciadores					MR	Patrón general
	(CAG) ₅	(GAC) ₅	(GACAC) ₃	(GTG) ₅	(TCC) ₅		
JG12	A	A	A	A	A	A	A
JG15	B	B	B	B	B	B	B
JG19	C	C	C	C	C	C	C
JG21	D	D	D	D	D	D	D
JG23	E	E	E	E	E	E	E
JG26	F	F	F	F	F	F	F
JG27	G	G	G	G	G	G	G
JG29	H	H	H	H	H	H	H
JG33	I	I	I	I	I	I	I
JG35	J	J	J	J	J	J	J
JG36	K	K	J	J	J	J	K
JG38	L	L	K	K	K	K	L
JG41	M	M	L	L	L	L	M
JG43	N	N	M	M	M	M	N
JG44	O	O	N	N	N	N	O
JG46	P	P	O	O	O	O	P
JG47	P	P	O	O	P	O	Q
JG51	Q	Q	P	P	Q	P	R
JG53	R	R	Q	Q	R	Q	S
JG54	S	S	Q	Q	R	R	T

En cuanto al análisis filogenético, la relación que se encontró en los agrupamientos fue de acuerdo al sitio de colecta de las muestras. En la figura 34 se observan dos grupos bien definidos (1 y 2).

En el grupo 1, se encontraron la mayoría de las cepas y todas ellas fueron aisladas de hojas, a excepción de JG21, que fue aislada del fruto. Este grupo a su vez se subdividió en los subgrupos 1A y 1B. En el subgrupo 1A se aprecia que las cepas JG35-G36, JG46-G47, JG27-G29 y JG38-G41, se encuentran estrechamente relacionadas y proceden de las localidades de Tekax (JG35-G36, JG46-G47) y Mérida (JG27-G29 y JG38-G41). Es preciso resaltar que las cepas JG38 y JG41, que se encuentran en el mismo clado, además de proceder de la misma localidad y de haber sido aisladas del mismo órgano de la planta, tienen en común al morfotipo del hongo. En el subgrupo 1B se agruparon las

cepas JG19, JG33 y JG43, las dos últimas que se encuentran más relacionadas entre sí, proceden de la localidad de Mérida, mientras que JG19 procede de Tekax.

En el grupo 2 se ubicó el menor número de cepas y ésta a su vez se subdividió en 2A y 2B. En el subgrupo 2A únicamente se encontró a JG23, la cual fue aislada del ápice del tallo en la localidad de Tekax; mientras que en el subgrupo 2B, se ubicaron las cepas JG51, JG53 y JG54, que además de ser aisladas del mismo órgano de la planta (hoja) y proceder de la misma localidad (Mérida), tienen en común al mismo morfotipo (morfotipo 3). Independientemente de estas coincidencias, a nivel molecular presentaron genotipos diferentes, lo cual indica que se trata de tres individuos diferentes.

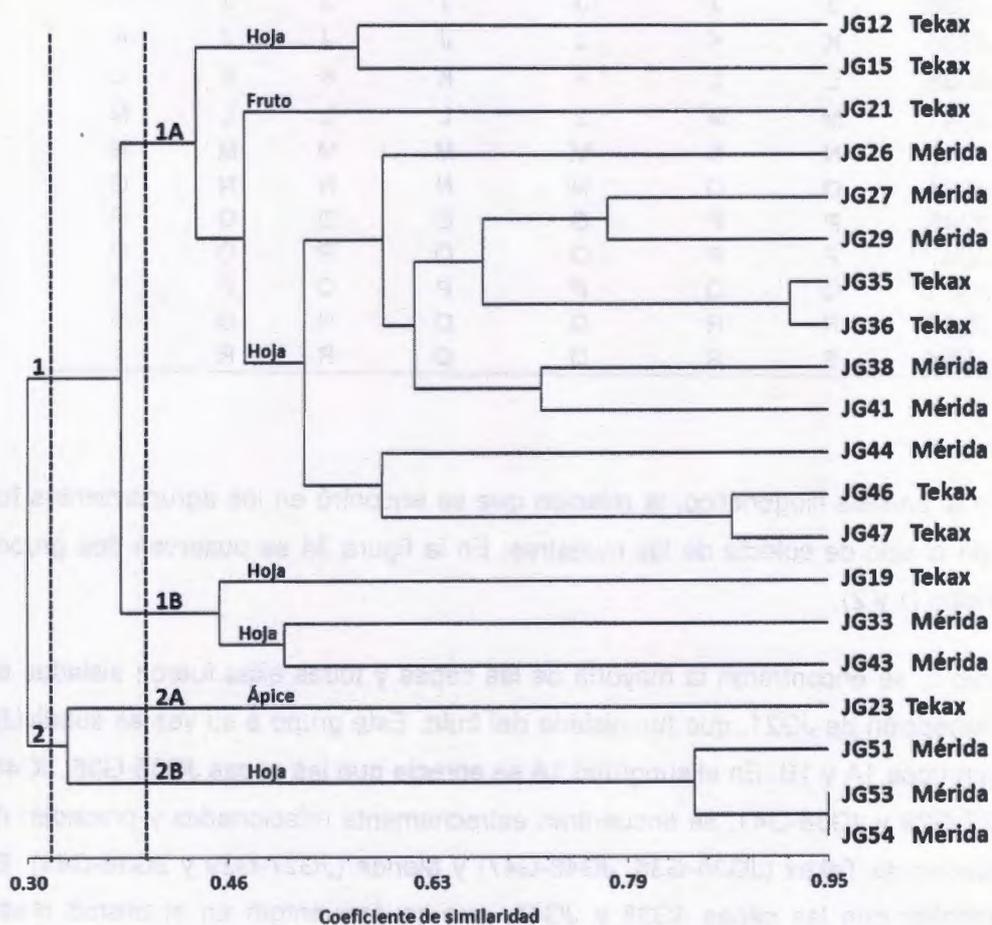


Figura 34. Dendrograma obtenido por UPGMA, basado en el análisis de los datos de todos los iniciadores con los aislados de *Colletotrichum gloeosporioides*.

3.4 DISCUSIÓN

El análisis de las secuencias de la región ITS completa (ITS1, ITS2) y el gen 5.8S del ADNr de los aislados fungosos encontrados como patógenos de *J. curcas*, permitió identificarlos, sin lugar a dudas, como pertenecientes a las especies *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium solani*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium decemcellulare*, *Alternaria alternata*, y *Lasiodiplodia theobromae*. La región ITS es el marcador genético más frecuentemente secuenciado de los hongos y es de uso rutinario para investigar aspectos relacionados con la sistemática, filogenia e identificación de cepas a nivel específico e intraespecífico (Nilsson *et al.*, 2008; Simon y Weiß, 2008; Yao *et al.*, 1999).

En cuanto a la técnica PCR-RFLP, resultó en este estudio un método simple y rápido para diferenciar cepas de *Fusarium* a nivel de especie. De acuerdo a la literatura, este método ha sido utilizado para distinguir diferentes especies de *Fusarium* y *Colletotrichum* (Chehri *et al.*, 2011; Maharaj y Rampersad, 2011; Tapia-Tussell *et al.*, 2008), así como también para comparar relaciones genéticas entre especies de *Fusarium* (Lee *et al.*, 2000) y para diferenciar formas especiales de *Fusarium solani* (Suga, 2000).

En nuestro estudio las enzimas *MspI*, *HaeIII* y *TaqI* nos permitieron diferenciar a las especies de *Fusarium solani*, *Fusarium equiseti* y *Fusarium decemcellulare*, debido a que generaron un solo perfil de bandas para cada una de ellas. Estos resultados coinciden con lo reportado por Chehri *et al.*, (2011), quien con seis enzimas de restricción (*EcoRI*, *SphI*, *PstI*, *HaeIII*, *MspI* y *SmaI*) fue capaz de diferenciar a cinco especies de *Fusarium* (*F. solani*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. equiseti* y *F. semitectum*) aisladas de cucurbitáceas en Irán.

Es preciso resaltar que aunque nuestro hospedero fue *Jatropha curcas* y los hongos fueron aislados en el Estado de Yucatán, obtuvimos los mismos perfiles de bandas con las enzimas *HaeIII* y *MspI* para *Fusarium solani* y *Fusarium equiseti* que los obtenidos por Chehri *et al.*, (2011) en patógenos de cucurbitáceas.

La gran diversidad genética que existe entre las cepas aquí estudiadas, se vio reflejada en los patrones generales de los aislados obtenidos utilizando la técnica AP-PCR con los seis iniciadores. Lo cual también confirmó que cada cepa es un individuo diferente.

Capítulo III

Las relaciones que se observaron entre las distintas cepas de *Alternaria alternata* y *Lasiodiplodia theobromae* estuvieron correlacionadas únicamente con la localidad de procedencia de las muestras. Las relaciones que existieron entre las cepas de *Fusarium* fue de acuerdo a su especie, sin embargo, a nivel de *Fusarium equiseti*, se observó que algunas muestras están estrechamente relacionadas con la localidad de procedencia y al órgano de la planta de donde se aisló la cepa. Finalmente las cepas de *Colletotrichum* tuvieron correlación con la localidad, lo cual coincide con lo reportado por Torres-Calzada *et al.*, 2012, quienes a partir de 22 aislados de *Colletotrichum gloeosporioides* obtenidos de *Carica papaya*, observaron que se agrupaban por localidades. Dentro de esta especie de hongo también pudimos notar que algunos agrupamientos tienen correlación, incluso con el grupo morfológico al que pertenecen.

3.5 REFERENCIAS

- Anderson, J. M., Aitken, E. A. B., Dann, E. K., Coates, L. M. (2013). Morphological and molecular diversity of *Colletotrichum* spp. causing pepper spot and anthracnose of lychee (*Litchi chinensis*) in Australia. *Plant Pathology*, 62, 279–288.
- Suga, H., Hasegawa, T., Mitsui, H., Kageyama, K., y Hyakumachi, M. (2000). Phylogenetic analysis of the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* based on the rDNA-ITS region. *Mycological Research*, 104, 1175-1183.
- Capote, N., Pastrana, A. M., Aguado, A., y Sánchez-Torres, P. (2012). Molecular Tools for Detection of Plant Pathogenic Fungi and Fungicide Resistance, *Plant Pathology*, Christian Joseph Cumagun (Ed.), InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/plantpathology/molecular-tools-for-detection-of-plant-pathogenic-fungi-and-fungicide-resistance>.
- Chehri, K., Salleh, B., Yli-Mattila, T., Reddy, K. R. N., Abbasi, S. (2011). Molecular characterization of pathogenic *Fusarium* species in cucurbit plants from Kermanshah province, Iran. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 18, 341–351.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39, 783–791.
- Goud, J. C. y Termorshuizen A. J. (2003) Quality of methods to quantify microsclerotia of *Verticillium dahliae* in soil. *European Journal of Plant Pathology*, 109, (6): 523- 534.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acid Symposium Series*, 41, 95-98.
- Jaccard P, (1901) .Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. *Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles* 37, 547–79.

- Lee, Y.M., Choi, L.Y., y Min, B.R.(2000). PCR-RFLP and sequence analysis of rDNA its region in the *Fusarium* spp. *Journal of Microbiology*. 38, 66–73.
- Maharaj, A., y Rampersad, S. N. (2011). Genetic differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. truncatum* associated with anthracnose disease of papaya (*Carica papaya* L.) and bell pepper (*Capsium annuum* L.) based on ITS PCR-RFLP fingerprinting. *Molecular Biotechnology*.
- McCartney, H. A., Foster, S. J., Fraaije, B. A., y Ward, E. (2003). Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. *Pest Management Science* 59: 129–142.
- Mills, P. R., Sreenivasaprasad, S., y Brown, A. E. (1992). Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. *FEMS Microbiology Letters*, 98, 137–144.
- Narayanasamy, P. (2011). Microbial plant pathogens-detection and disease diagnosis. *Fungal Pathogens*, 1.
- Nguyen, T. H. P., Säll, T., Bryngelsson, T., y Liljeroth, E. (2009). Variation among *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from infected coffee berries at different locations in Vietnam. *Plant Pathology*, 58, 898–909.
- Nilsson, R.H., Kristiansson, E., Ryberg, M. y Hallenberg, N. (2008). Intraspecific ITS variability in the kingdom *Fungi* as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. *Evolutionary Bioinformatics*, 4: 193–201.
- Rohlf FJ, 2000. NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Setauket, NY, USA: Exeter Software.
- Sambrook, J. y Russell, D (2000). Molecular cloning: a laboratory manual. Third edition Cold Spring, 2344.

- Simon, U.K., y Weiß, M. (2008). Intragenomic variation of fungal ribosomal genes is higher than previously thought. *Molecular Biology and Evolution*, 25 (11): 2251-2254.
- Suga, H., Hasegawa, T., Mitsui, H., Kageyama, K., y Hyakumachi, M. (2000). Phylogenetic analysis of the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* based on the rDNA-ITS region. *Mycological Research*, 104, 1175-1183.
- Talhinhas, P., Sreenivasaprasad, S., Neves-Martin, J., y Oliveira, H. (2002). Genetic and morphological characterization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose of lupins. *Phytopathology*, 92, 986-996.
- Tapia-Tussell, R., Lappe, P., Ulloa, M., Quijano-Ramayo, A., Cáceres-Farfán, M., Larque-Saavedra, A., y Perez-Brito, D. (2006). A rapid and simple method for DNA extraction from yeasts and fungi isolated from *Agave fourcroydes*. *Molecular Biotechnology*, 33, 67-69.
- Tapia-Tussell, R., Quijano-Ramayo, A., Cortes-Velazquez, A., Lappe, P., Larque-Saavedra, A., y Perez-Brito, D. (2008). PCR-Based Detection and Characterization of the Fungal Pathogens *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum capsici* Causing Anthracnose in Papaya (*Carica papaya* L.) in the Yucatan Peninsula. *Molecular Biotechnology*, 40: 293-298.
- Torres-Calzada C, Tapia-Tussell R, Higuera-Ciapara I, Perez-Brito D. (2012). Morphological, pathological and genetic diversity of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose in papaya (*Carica papaya* L). *European Journal of Plant Pathology*.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR protocols: a guide to the methods and applications. Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J. (eds.), Academic Press. New York. USA. 315-322.

Capítulo III

Yao, Y. J., Pegler, D. N. y Chase, M. W. (1999). Application of ITS (nrDNA) sequences in the phylogenetic study of *Tyromyces*. *Mycological Research*, 103: 219-229.

CAPÍTULO IV. DISCUSION GENERAL Y CONCLUSIONES

4.1 DISCUSIÓN GENERAL

El cultivo de *Jatropha curcas* se ha incrementado en los últimos años en México, dada la promesa que encierra su producción, respecto a la obtención de biodiesel sin afectar la producción alimentaria (Contran *et al.*, 2013; Galaz-Ávalos *et al.*, 2012; Reddy *et al.*, 2008).

Sin embargo, la ampliación de las áreas plantadas con esta especie, y en muchos casos con variedades de diferente procedencia, ha traído consigo el incremento de las afectaciones por plagas y enfermedades (Anitha y Varaprasad 2012; Machado y Pereira 2012; Ginting y Maryono 2009).

Dentro de los patógenos que más han incidido y afectado los rendimientos de frutos en este cultivo, en Yucatán destacan los fungos y esta problemática se ha presentado en otros países donde se planta *J. curcas* desde hace varios años, como la India (Rao *et al.*, 2011; Latha *et al.*, 2009; Sharma y Kumar 2009; Sharma *et al.*, 2001).

La combinación de características morfológicas, técnicas moleculares y las pruebas de patogenicidad confirmaron que hay una gran variedad de especies de hongos patógenos de *Jatropha curcas* en el Estado de Yucatán, lo que corrobora la hipótesis planteada al inicio del presente trabajo. Las especies que se identificaron fueron *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium solani*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium decemcellulare*, *Alternaria alternata*, y *Lasiodiplodia theobromae* y todas ellas han sido reportadas en otras latitudes como patógenos de esta planta (Kumar *et al.*, 2013; Zarafi y Abdulkadir 2012; Jin-Hyeuk *et al.*, 2012; Espinoza-Verduzco *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2012; De Campos *et al.*, 2010).

La caracterización morfológica realizada mostró una gran diversidad dentro de cada especie bajo estudio. De todas ellas, se destacó la variabilidad morfológica de los catorce aislados de *Fusarium* sp que se concentraron en siete grupos morfológicos. Las 12 cepas de *Fusarium equiseti* se ubicaron en seis grupos morfológicos (1-6), mientras que la única cepa de *Fusarium decemcellulare* (JG67) se encontró en el grupo 7, el cual se distinguió

de los demás por su coloración, velocidad de crecimiento y dimensiones de conidios. No obstante, la única cepa de *Fusarium solani* (JG2), se ubicó compartiendo el mismo grupo morfológico (grupo 3) que JG3 identificado como *Fusarium equiseti*, esto pone de manifiesto que las características de las colonias no son suficientes como para sugerir con certeza la especie a la cual pertenecen los aislados (McKay *et al.*, 2009; Arruda *et al.*, 2005; Photita *et al.*, 2005; Rotem 1994).

Las siete cepas de *Alternaria alternata* formaron cuatro grupos morfológicos, los cuales coinciden en número por lo reportado por Pryor y Michailides, (2002) quienes pudieron diferenciar cuatro especies de *Alternaria* por morfología colonial (uno por cada grupo). Sin embargo, en este estudio se observó que aunque pertenece a la misma especie, los aislados presentan diferencias morfológicas, lo cual se debe a la plasticidad que esta especie presenta (Simmons 1992; Misaghi *et al.*, 1978).

Para el caso de *Colletotrichum gloeosporioides*, los veinte aislados se agruparon en cinco grupos morfológicos los cuales son semejantes en apariencia a lo reportado por Torres-Calzada *et al.*, (2012), mientras que para *Lasiodiplodia Theobromae* estos coinciden con lo reportado por Sangeetha *et al.*, (2012) y por Shah *et al.*, (2010).

La región ITS mostró su utilidad para la identificación a nivel de especie de los organismos fungosos (Nilsson *et al.*, 2008) aquí encontrados en *Jatropha curcas*. Sin embargo, con la técnica PCR-RFLP no se generaron polimorfismos intraespecíficos en la región ITS de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium solani*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium decemcellulare*, *Alternaria alternata*, y *Lasiodiplodia theobromae*, aunque sí se obtuvieron perfiles únicos para cada una de estas especies. No obstante, esta técnica fue capaz de diferenciar a las tres especies de *Fusarium*, siendo las enzimas *HaellI*, *MspI* y *TaqI* las más resolutivas. Todo esto indicó que este método marcó diferencias de una especie a otra, pero no dentro de la misma especie en los casos aquí estudiados, esto coincide con lo reportado por Maharaj y Rampersad 2011; Chehri *et al.*, 2011 y Tapia-Tussell *et al.*, 2008. Aunque hay estudios que han mostrado la utilidad de esta técnica para diferenciar aislados de una misma especie (Maharaj y Rampersad 2011; Chehri *et al.*, 2011; Masratul *al.*, 2010; Brasileiro *et al.*, 2004; Suga *et al.*, 2000).

La técnica AP-PCR reveló polimorfismos intraespecíficos y dependiendo de la cepa y del iniciador utilizado, se obtuvieron diferentes perfiles. Los iniciadores que presentaron mayor nivel de discriminación entre cepas para *Colletotrichum gloeosporioides*, fueron (CAG)₅ y MR, mientras que para *Fusarium* sp., fue (GACAC)₃. Para *Alternaria alternata*, todos mostraron su utilidad para este fin a excepción de MR y para *Lasiodiplodia theobromae* el único resolutivo fue (CAG)₅. Estos hallazgos coinciden con Torres-calzada *et al.*, 2012; y Brasileiro *et al.*, 2004; donde esta técnica ha podido utilizarse para distinguir entre individuos de una misma especie de hongo.

Al analizar los patrones generales de huellas genéticas, obtenidos mediante el estudio polifásico realizado en este trabajo, podemos asumir que todas las cepas estudiadas son individuos diferentes, lo que confirma la importancia de la combinación de herramientas moleculares para distinguir entre cepas de la misma especie y se corrobora que el empleo de más de una técnica de este tipo, puede revelar todas las diferencias existentes a nivel intraespecífico. De ahí que se sugiere la necesidad de combinar técnicas de huellas genéticas más que usarlas individualmente en los estudios de caracterización molecular de hongos (Brasileiro *et al.*, 2004; Pryor y Michailides 2002).

Aunque la mayoría de la literatura considera a *J. curcas* resistente a enfermedades, (Anitha y Varaprasad 2012; Machado y Pereira 2012; Ginting y Maryono 2009) en este trabajo de investigación se da a conocer una diversidad de hongos patógenos asociados a esta planta.

La importancia de este trabajo radica en que la mayoría de estos hongos, con las condiciones de clima adecuadas, pueden convertirse en un problema grave para los agricultores de Yucatán, debido a que pueden causar severas epidemias en el cultivo de *J. curcas*, y con ello reducir la producción de las plantaciones.

Los hallazgos de este estudio, permitirán a los productores y especialistas fitosanitarios relacionados con la producción de *J. curcas* en el Estado, tener información real y actual sobre los principales patógenos fungosos del cultivo en la región, su gran variabilidad y en consecuencia, posibilitará que se tomen decisiones de manejo de enfermedades fundamentadas y que logren un adecuado control de las mismas.

4.2 CONCLUSIONES

- Se identificaron a *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium solani*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium decemcellulare*, *Alternaria alternata* y *Lasiodiplodia theobromae* afectando a *Jatropha curcas* en Yucatán.
- Todas las especies identificadas resultaron patogénicas para *Jatropha curcas*.
- Se obtuvo la huella genética para todas las cepas identificadas.
- Con el uso de la enzima *HaeIII* se pueden diferenciar las tres especies de *Fusarium* (*F. solani*, *F. equiseti* y *F. decemcellulare*) encontradas en este hospedero.
- La técnica AP-PCR fue más resolutiva que la PCR-RFLP ya que reveló los polimorfismos intraespecíficos de las especies bajo estudio.

4.3 PERSPECTIVAS

- Evaluar *in vitro* la efectividad biológica de fungicidas contra las diferentes cepas caracterizadas para hacer recomendaciones adecuadas en el manejo fitosanitario integrado en el cultivo de *Jatropha curcas*.

4.4 REFERENCIAS

- Anitha, K. y Varaprasad, K. S. (2012). *Jatropha* Pests and Diseases: An Overview. In: *Jatropha, Challenges for a New Energy Crop*. Carels, N. (ed), Farming, Economics and Biofuel, 175-218.
- Arruda, G. M. T., Miller, R. N. G., Ferreira, M. A. S. V., y Café-Filho, A. C. (2005). Morphological and molecular characterization of the sudden-death syndrome pathogen of soybean in Brazil. *Plant Pathology*, 54, 53–65.
- Brasileiro, B. T. R. V., Coimbra, M. R. M., de Moraes Jr, M. A. y de Oliveira, N. T. (2004). Genetic variability within *Fusarium solani* as revealed by PCR-fingerprinting base on PCR markers. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35: 205-210.
- Chehri, K., Salleh, B., Yli-Mattila, T., Reddy, K. R. N., Abbasi, S. (2011). Molecular characterization of pathogenic *Fusarium* species in cucurbit plants from Kermanshah province, Iran. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 18, 341–351.
- Contran, N., Chessa, L., Lubino, M., Bellavite, D., Roggero, P. P. y Enne, G. (2013). State-of-the-art of the *Jatropha curcas* productive chain: From sowing to biodiesel and by-products. *Industrial Crops and Products*, 42: 202– 215.
- De campos, D. A., Carmine, D. J. y Dos santos J. J. de G. (2010). New records for the Brazilian Cerrado of leaf pathogens on *Jatropha curcas*. Boletim de pesquisa e desenvolvimento. Embrapa cerrados, 13p.
- Espinoza-Verduzco, M. de los A., Santos-Cervantes, M. E., Fernández-Herrera, E., Espinoza-Mancillas, M. G., Chávez-Medina, J. A., Bermúdez-Álvarez, E. M. Martínez-Ayala, A. L., Méndez-Lozano, J., y Leyva-López, N. E. (2012): First report of *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler causing inflorescence blight in *Jatropha curcas* in Sinaloa, Mexico, *Canadian Journal of Plant Pathology*.

- Galaz-Ávalos, R. M., Avilez-Montalvo, R. N., Ucan-Uc, C. M., Chan-López, J. A. y Loyola-Vargas, V. M. (2012). *Jatropha curcas* una Alternativa para la obtención de Biodiésel sin afectar al sector alimentario. *BioTecnología*, 16 (2): 94-114.
- Ginting, C. y Maryono, T. (2009). Physic nut (*Jatropha curcas* L.) Diseases in Lampung Province. *Biotropia*, 16 (1): 45-54.
- Jin-Hyeuk, K., Choi, O., Kim, J. y Kwak, Y. (2012) First report of Anthracnose disease on *Jatropha curcas* caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in Korea. *Journal Phytopathology*, 160(5): 255–257.
- Kumar, R., Kumari, A., Sinha, A., y Maurya, S. (2013). New report of *Lasiodiplodia theobromae* causing *Jatropha* decline in Eastern Plateau and Hill region of India, *Archives Of Phytopathology and Plant Protection*.
- Kumar, R., Srivastava, S., Sinha, A., Sarma, B.K. y Kamil, D. (2012). First report of *Alternaria alternata* causing fruit rot disease of *Jatropha curcas* from India. Short communication. *Journal of Mycology and Plant Pathology*, 42 (2).
- Latha, P., Prakasam, V., Kamalakannan, A., Gopalakrishnan, C., Raguchander, T., Paramathma, M., y Samiyappan, R. (2009). First report of *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl causing root and collar rot disease of physic nut (*Jatropha curcas* L.) in India. *Australasian Plant Disease Notes*, 4: 19–21.
- Machado, A. R., y Pereira, O. L. (2012). Major Diseases of the Biofuel Plant, Physic Nut (*Jatropha curcas*). In: Biodiesel-Feedstocks, Production and Applications. Zhen, F (Ed). InTech, 49-75.
- Maharaj, A., y Rampersad, S. N. (2011). Genetic differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. truncatum* associated with anthracnose disease of papaya (*Carica papaya* L.) and bell pepper (*Capsium annuum* L.) based on ITS PCR-RFLP fingerprinting. *Molecular Biotechnology*.

- Masratul, H. M., Salleh, B. y Latiffah, Z. (2010). Characterization and intraspecific variation of *Fusarium semitectum* (Berkeley and Ravenel) associated with red-fleshed dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus* [Weber] Britton and Rose) in Malaysia. *African Journal of Biotechnology*, 9(3): 273-284.
- McKay, S. F., Freeman, S., Minz, D., Maymon, M., Sedgley, M., Collins, G. C. y Scott, E. S. (2009). Morphological, genetic, and pathogenic characterization of *Colletotrichum acutatum*, the cause of Anthracnose of Almond in Australia. *Phytopathology*, 99 (8): 985-995.
- Misaghi, I. J., Grogan, R. G., Duniway, J. M., y Kimble, K. A. (1978). Influence of environmental and culture media on spore morphology of *Alternaria alternata*. *Phytopathology*, 68: 29-34.
- Nilsson, R.H., Kristiansson, E., Ryberg, M. y Hallenberg, N. (2008). Intraspecific ITS variability in the kingdom *Fungi* as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. *Evolutionary Bioinformatics*, 4: 193–201.
- Photita, W., Taylor, P. W. J., Ford, R., Hyde, K. D., y Lumyong, S. (2005). Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* species from herbaceous plants in Thailand. *Fungal Diversity*, 18, 117–133.
- Pryor, B. M. y Michailides, T. J. (2002). Morphological, Pathogenic, and Molecular Characterization of *Alternaria* Isolates associated with *Alternaria* Late Blight of Pistachio. *Phytopathology*, 92: 406-416.
- Rao, C. S., Kumari, M. P., Wani, S. P. y Marimuthu, S. (2011). Occurrence of black rot in *Jatropha curcas* L. plantations in India caused by *Botryosphaeria dothidea*. *Current Science*, 100 (10): 1547-1549.

- Reddy, B. V. S., Ramesh, S., Ashok Kumar, A., Wani, S. P., Ortiz, R., Ceballos, H. y Sreedevi, T. K. (2008). Biofuel crops research for energy security and rural development in developing countries. *Bioenergy Research*, 1: 248–58.
- Rotem, J. (1994). The Genus *Alternaria*: biology, epidemiology and pathogenicity. American Phytopathological Society Press, St Paul, M. N.
- Sangeetha, G., Arandan, A., y Usha Rari, S. (2012). Morphological and molecular characterisation of *Lasiodiplodia theobromae* from various banana cultivars causing crown rot disease in fruits, *Archives Of Phytopathology and Plant Protection*, 45 (4): 475-486.
- Suga, H., Hasegawa, T., Mitsui, H., Kageyama, K., y Hyakumachi, M. (2000). Phylogenetic analysis of the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* based on the rDNA-ITS region. *Mycological Research*, 104, 1175-1183.
- Shah, M. D., Verma, K. S., Singh, K., y Kaur, R. (2010). Morphological, pathological and molecular variability in *Botryodiplodia theobromae* (Botryosphaeriaceae) isolates associated with die-back and bark canker of pear trees in Punjab, India. *Genetics and Molecular Research*, 9 (2): 1217-1228.
- Sharma, S., Kaushik, J. C., y Kaushik, N. (2001). *Fusarium moniliforme* causing root rot of *Jatropha*. *Indian Phytopathology*, 54: 275.
- Sharma, S., y Kumar, K. (2009). Root rot of *Jatropha curcas* incited by *Rhizoctonia bataticola* in India. *Indian Forester*, 135: 433–434.
- Simmons, E. G. (1992). *Alternaria* taxonomy: Current status, viewpoint, challenge. in: *Alternaria Biology, Plant Diseases and Metabolites*. J. Chelkowski and A. Visconti (eds). Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1-35.
- Tapia-Tussell, R., Quijano-Ramayo, A., Cortes-Velazquez, A., Lappe, P., Larqué-Saavedra, A., y Perez-Brito, D. (2008). PCR-Based Detection and Characterization

of the Fungal Pathogens *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum capsici* Causing Anthracnose in Papaya (*Carica papaya* L.) in the Yucatan Peninsula. *Molecular Biotechnology*, 40: 293–298.

Torres-Calzada, C., Tapia-Tussell, R., Higuera-Ciapara, I. y Perez-Brito, D. (2012). Morphological, pathological and genetic diversity of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose in papaya (*Carica papaya* L). *European Journal of Plant Pathology*.

Zarafi, A. B. y Abdulkadir, I. D. (2012). Identification and host range of causal agent of dieback disease on *Jatropha curcas*. *Archives Of Phytopathology and Plant Protection*, 45:9, 1096-1100.

ANEXOS

Anexo 1. Preparación de los geles de poliacrilamida

Solución Stock acrilamida/bisacrilamida al 40% (29:1)

Reactivo	Cantidad
Acrilamida	386.7 g
Bisacrilamida	13.4 g
H ₂ O bidestilada	Completar a 1L

Para preparar un gel de poliacrilamida al 6% (18 cm X 16 cm)

Reactivo	Cantidad (mL)
Solución Stock de acrilamida/bisacrilamida al 40%	6.0
Buffer TG (5X)	8.0
H ₂ O bidestilada	26.0
APS 25%	0.2
TEMED	0.02
Volumen total	40.22

Anexo 2. Tinción de plata

1. El gel de acrilamida se transfiere a un recipiente y se mantiene en agitación constante durante 5 min con la solución fijadora (Solución 1).
2. Se retira la solución fijadora y se agrega la solución de tinción de nitrato de plata al 0.2% (Solución 2), con la cual se deja en agitación durante 15 min.
3. Seguidamente se realizan tres lavados con agua bidestilada para eliminar los residuos de plata y se agrega la solución reveladora (Solución 3), con la que se incuba en agitación hasta la aparición de bandas nítidas.
4. Por último se aplica la solución de detección de la reacción (Solución 4).

Solución (1) Fijadora

Reactivo	Cantidad (mL)
Etanol absoluto	40
Ácido acético glacial	2
H ₂ O bidestilada	358
Volumen total	400

Solución (2) de tinción con plata (AgNO₃ al 0.2%)

Reactivo	Cantidad
AgNO ₃	0.8 g
H ₂ O bidestilada	400 mL
Volumen total	400 mL

Solución (3) reveladora

Reactivo	Cantidad
NaOH	12 g
Formaldehído*	2 mL
H ₂ O bidestilada	400 mL
Volumen total	400 mL

*El formaldehído se debe añadir a la solución justo antes de usar

Solución (4) de detención de la reacción

Reactivo	Cantidad
EDTA	15 g
H ₂ O bidestilada	500 mL
Volumen total	500 mL

Anexos

Anexo 3. Preparación de Buffer de corrida

Buffer de corrida TBE 10X (pH 8) para geles de agarosa

Reactivo	Cantidad
Trizma Base	108 g
Ácido Bórico	55 g
EDTA 0.5 M	40 mL
H ₂ O bidestilada	Completar a 1L

Buffer de corrida TG 10X (pH8) para geles de poliacrilamida

Reactivo	Cantidad
Trizma Base	140 g
Glicina	30 g
H ₂ O bidestilada	Completar a 1L

Buffer de carga para geles de poliacrilamida

Reactivo	Concentración final	Cantidad
1 M Tris pH8	50 mM	2 mL
0.5 M EDTA pH8	5 mM	0.4 mL
Sacarosa	25%	10g
Azul de bromofenol (BPD)	2 mg/mL	0.8 g
Xilencianol (XC)	2 mg/mL	0.8 g
H ₂ O bidestilada		Completar a 40 mL
