

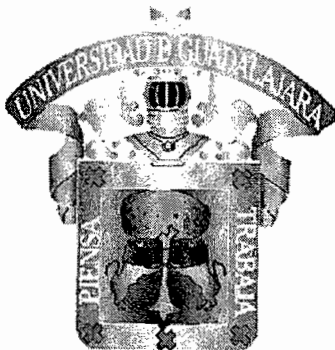
1997

CODIGO 093684729

193161165

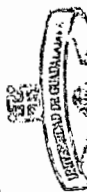
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS



IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE *Colletotrichum falcatum* Went MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN Y PCR-ITS

CUCBA



TRABAJO DE TITULACIÓN EN LA MODALIDAD DE

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

P R E S E N T A N

MARTHA PAOLA DE LOZA MACÍAS

MARÍA ELIZABETH VILLALOBOS ALCALÁ

Las Agujas, Zapopan, Jal., Mayo del 2003



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

COORDINACIÓN DE CARRERA DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

COMITÉ DE TITULACIÓN



CC. MARTHA PAOLA DE LOZA MACÍAS Y/O
MARÍA ELIZABETH VILLALOBOS ALCALÁ
PRESENTE.

Manifiestamos a Usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de TESIS E INFORMES opción Tesis con el título "IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE *Colletotrichum falcatum* Went MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN Y PCR-ITS", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo les informamos que ha sido aceptado como Director de dicho trabajo al M.C. FERNANDO RAMÍREZ CERVANTES y como Asesora del mismo la DRA. ANNE SANTERRE LUCAS.

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"

"2002. Año Constancio Hernández Alvirde"
Las Agujas, Zapopan Jalisco, 08 de julio del 2002



DRA. MÓNICA ELIZABETH RIOJAS LÓPEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN


M.C. LETICIA HERNÁNDEZ LÓPEZ
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

c.c.p. M.C. FERNANDO RAMÍREZ CERVANTES.- Director del Trabajo.

c.c.p. DRA. ANNE SANTERRE LUCAS.- Asesora del Trabajo.

c.c.p. Expediente del alumno

MERL:HL/aman

Km. 15.5 Carretera Guadalajara - Nogales
Predio "Las Agujas", Nahuatlán, C.P. 46110 e AP 39-82
Tels (91 31) 682-0248 682-0374 Fax. 6820120
Zapopan, Jalisco, México

**DRA. MÓNICA ELIZABETH RIOJAS LÓPEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN
DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES
P R E S E N T E**


Por medio de la presente, nos permitimos informar a usted, que habiendo revisado el trabajo de tesis que realizaron las pasantes Martha Paola de Loza Macías y María Elizabeth Villabobos Alcalá con el título: Identificación morfológica y molecular de *Colletotrichum falcatum* Went mediante microscopía electrónica de transmisión y PCR-ITS, consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorización de impresión y en su caso programación de exámenes de tesis y profesional respectivos.

Sin otro particular, agradecemos de antemano la atención que sirva brindar a la presente y aprovechamos la ocasión para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

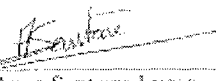
Las Agujas, Zapopan, Jal., a 25 Febrero del 2003.

EL DIRECTOR DE TESIS


M. de C. Fernando Ramírez Cervantes

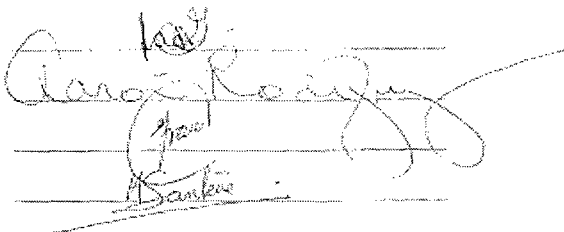


EL ASESOR


Dra. Anne Santerre Lucas
COORDINADORA DE LA CARRERA DE
LICENCIADO EN BIOLÓGIA

SINODALES

- 1.- M. de C. Amando Arias García
- 2.- Dr. Aron Rodríguez Contreras
- 3.- Dra. Graciela Guillón Cabrera
- 4.- Dra. Anne Santerre Lucas



AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por permitirnos concluir esta etapa a pesar de todo. Agradecemos a nuestros **padres** por su apoyo durante toda nuestra formación como Lic. en Biología, a toda la **familia**, abuelos, tíos y primos que siempre tuvieron palabras para alentarnos y seguir adelante.

A nuestros **amigos** que de igual manera siempre estuvieron con nosotras en todo momento y decisión. A todos los **maestros**, que siempre nos transmitieron entusiasmo, formando inquietudes en el área. Al **M. en C. Fernando Ramírez Cervantes**, director de tesis por el apoyo que nos ha brindado, por creer en nosotras y despertar aun más nuestro entusiasmo de seguir preparándome además de ser ejemplo de **esfuerzo y dedicación**.

Martha Paola de Loza Macías
María Elizabeth Villalobos Alcalá

INDICE

ÍNDICE.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABLAS.....	v
1.- RESUMEN.....	1
2.- INTRODUCCIÓN.....	2
3.- ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN.....	4
3.1.- CAÑA DE AZÚCAR.....	4
3.1.1.- Origen y descripción botánica.....	4
3.1.2.- Importancia económica y social.....	7
3.1.3.- Enfermedades de importancia económica en México.....	8
3.2.- MUERMO ROJO.....	9
3.2.1.- Origen y descripción.....	9
3.2.2.- Impacto económico.....	10
3.2.3.- Agente causal.....	11
3.3.- CRITERIOS DE IDENTIFICACIÓN.....	12
3.3.1.- Morfológico.....	13
3.3.2.- Molecular.....	16
3.3.2.1.- Marcadores protéicos.....	18
3.3.2.2.- Marcadodes de ADN.....	19
3.4.- INTERPRETACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA.....	23
4.- OBJETIVOS.....	25
4.1.- Objetivo general.....	25

CUCIBA
 7

4.2.-	Objetivos específicos.....	25
5.-	HIPÓTESIS.....	26
6.-	MATERIAL Y MÉTODOS.....	27
6.1.-	Muestreo.....	28
6.2.-	Diferenciación morfológica	28
6.3.-	Diferenciación molecular.....	31
6.4.-	Análisis del ADN ribosomal mediante PCR-ITS.....	34
7.-	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
9.-	CONCLUSIONES.....	50
10.-	BIBLIOGRAFÍA.....	52

LISTADO DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Ingenios azucareros muestreados.....	4
Figura 2. Representación esquemática de la caña de azúcar.....	6
Figuras 3. Lesiones características de la enfermedad muermo rojo.....	10
Figura 4. Características morfológicas de <i>C. falcatum</i> en agar papa dextrosa.....	12
Figura 5. Micrografía de campo luminoso de apesorios de <i>Colletotrichum</i> spp.....	14
Figura 6. Esquemas del mecanismo de infección del genero <i>Colletotrichum</i>	15
Figura 7. Microfotografía electrónica de barrido.....	16
Figura 8. Esquema del arreglo de los genes de rDNA en eucariotes.....	23
Figura 9. Esquema de la estrategia general de investigación.....	28
Figura 10. Diferenciación macroscópica de <i>C. falcatum</i> en PDA.....	39
Figura 11. Vista microscópica de conidios de <i>C. falcatum</i> y <i>Fusarium</i> spp. en PDA.....	39
Figura 12. Vista microscópica del cambio morfológico del micelio de <i>C. falcatum</i> en PDA.....	40
Figura 13. Apesorios característicos de <i>C. falcatum</i> en PDA.....	41
Figura 14. Picnidio de <i>C. falcatum</i> en PDA.....	41
Figura 15. Estructuras sexuales de <i>C. falcatum</i> en estrés nutricional en	

PDA.....	42
Figura 16. Microfotografía de conidios de <i>C. falcatum</i>	43
Figura 17. Descripción del ciclo biológico sexual y asexual de <i>C. falcatum</i>	44
Figura 18. Análisis del ADN de <i>C. falcatum</i> en agarosa 0.8 %.....	46
Figura 19. Análisis en agarosa 1.2 %, de productos de PCR de ADN de <i>C. falcatum</i> amplificados con ITS1 e ITS4.....	47
Figura 20. Análisis de la digestión enzimática de los productos de PCR –ITS de <i>C. falcatum</i> mediante <i>Acc 1</i> en gel de poliacrilamida al 10 %.	48
Figura 21. Análisis de la digestión enzimática de los productos de PCR –ITS de <i>C. falcatum</i> mediante <i>Ava 1</i> en gel de poliacrilamida al 10 %.....	49

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1.- Clasificación taxonómica de caña de azúcar.....	5
Tabla 2.- Enfermedades de importancia económica en caña de azúcar	9
Tabla 3.- Efecto en la composición de minerales en variedades de caña de azúcar.....	11
Tabla 4. Variedades muestreadas en los estados de Tamaulipas y Veracruz.....	36
Tabla 5. Hongos identificados en variedades de interés comercial en Tamaulipas.....	37
Tabla 6. Hongos identificados en variedades de interés comercial en Veracruz	37
Tabla 7. Efecto de la pureza del ADN de <i>C. falcatum</i> , con y sin tratamiento con RNAsa en los aislados de Veracruz.....	45
Tabla 8. Efecto de la pureza del ADN de <i>C. falcatum</i> , con y sin tratamiento con RNAsa en los aislados de Tamaulipas.....	45

CUCBA

ESTADO DE TAMAU-LIPAS

1- RESUMEN

Del muestreo realizado en los campos experimentales de los ingenios azucareros de El Mante en Tamaulipas y Zapoapita en Veracruz, se obtuvieron 552 aislados fúngicos, en base a sus características morfológicas se dividieron en 7 grupos de los géneros: *Alternaria*, *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Trichoderma*, *Aspegillus*, *Penicillium*; además de un grupo aún no identificado.

Los aislados del género *Colletotrichum* se compararon con una cepa certificada (IFO31440B) de *C. falcatum* procedente del Institute for Fermentation of Osaka, Japón, la cual fue reactivada en PDA. Lo anterior permitió identificar mediante microscopia de campo luminoso estructuras somáticas (micelio, conidios), de infección (apresorios), así como estructuras de reproducción asexual (picnidios) y sexual (peritecios) logrando describir el ciclo biológico de *C. falcatum*. La obtención de microfotografías por medio de microscopia electrónica de transmisión permitió la identificación de estructuras celulares de dicho hongo (septo, cuerpos de woronin y núcleo en conidios).

Para la identificación de los aislados se realizó una prueba molecular por medio de PCR-ITS a la cepa de referencia y los aislados; los cuales amplificaron correctamente las regiones internas transcritas del ADN ribosomal para *C. falcatum*, con un peso molecular de 560 pb. Los productos se sometieron a una digestión enzimática con *Acc1* y *Ava1*, teniendo como control positivo al plásmido, confirmando su especificidad en el control positivo, no así en los aislados tipificados como *C. falcatum*.

2.- INTRODUCCIÓN

Colletotrichum es uno de los géneros fitopatógenos más importantes en todo el mundo, especialmente en regiones tropicales y subtropicales. El género causa pérdidas económicamente importantes en cereales, legumbres y cultivos perennes, incluyendo árboles frutales. Todas las partes de las plantas pueden ser afectadas en todos los estados de maduración. Los síntomas característicos del daño ocasionado por este género son comúnmente conocidos como antracnosis (Bailey *et al.*, 1992).

En caña de azúcar la enfermedad ocasionada por *Colletotrichum falcatum* es conocida como muermo rojo o pudrición roja (Viswanathan *et al.*, 1998). Su vector principal es el gusano barrenador del tallo (*Diatraea spp.*), que se caracteriza por la aparición de manchas de color rojo a lo largo del tallo, variando en su intensidad en las variedades susceptibles, provocando una disminución del contenido de sacarosa con el consecuente impacto económico (Chona, 1980).

La magnitud de este problema, ha propiciado la implementación de diversos programas de control químico, biológico y cultural sobre el vector. Sin embargo, se reconoce que la mejor estrategia consiste en la obtención de variedades resistentes, por lo que es necesario generar información acerca de la diferenciación morfológica y molecular del agente causal que permitan evaluar su variabilidad genética y patogénica con fines mejoradores.

Por lo que se plantea para este trabajo, realizar una identificación morfológica de *Colletotrichum falcatum* mediante microscopía electrónica

de transmisión así como desarrollar una técnica de diagnóstico molecular mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual representa una alternativa para determinar la presencia de dicho hongo fitopatógeno en variedades de interés comercial de caña de azúcar. Su adecuada aplicación favorecería la identificación de secuencias diferentes en las regiones internas transcritas (ITS), en especies muy relacionadas (Wharton *et al.*, 2001).

3.- ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

3.1- CAÑA DE AZÚCAR

3.1.1.- Origen y descripción botánica

El origen de la caña de azúcar (*Sacharum officinarum*) no se encuentra bien definido, sin embargo, la teoría más admitida es que proviene de Nueva Guinea (Humbert, 1984). En México, su cultivo fue introducido por Hernán Cortés, en la época de la conquista (1519-1521) siendo Santiago Tuxtla, Veracruz (Figura 1) el primer lugar del territorio nacional donde se estableció como cultivo (Flores, 1997). La caña de azúcar pertenece a la familia de las gramíneas y de acuerdo con Gould y Shaw en 1992 se distinguen cinco especies (Tabla 1), de las cuales *S. officinarum* es la más importante debido a sus características agroindustriales.



Figura 1. Establecimiento del cultivo de caña de azúcar.

Tabla 1.- Clasificación taxonómica de caña de azúcar

Reino	Vegetal
División	Espermatofitas
Subdivisión	Angiospermas
Clase	Monocotiledóneas
Orden	Glumifloras
Familia	Gramíneas
Tribu	Andropogoneae
Subtribu	Sacarineae
Género	<i>Saccharum</i>
Especie	<i>S. officinarum</i> , <i>S. barberie</i> , <i>S. sinense</i> (nobles); <i>S. spontaneum</i> y <i>S. robustum</i> (silvestres)



Fuente: Gould y Shaw, 1992

La caña de azúcar es una planta herbácea de 4 o más metros de altura, de raíces fibrosas y adventicias. Su tallo es grueso (aproximadamente de 4 – 4.5 cm) del cual brotan nuevos tallos (a partir de las yemas), constituidos de nudos y entrenudos de longitud y número variable; con coloración superficial que varía entre blanco, amarillo, verde, rojo y púrpura (Humbert, 1984). Los nudos son tabiques de separación formados por fibras más externas, los entrenudos son generalmente cilíndricos, lisos con grietas longitudinales y, en cuya base está la yema. Las hojas están compuestas de vaina, cuello y lámina. La vaina es glabra,

cilíndrica y abierta hasta la base, con terminaciones cortas, triangulares y de ápice redondeado (Figura 2).

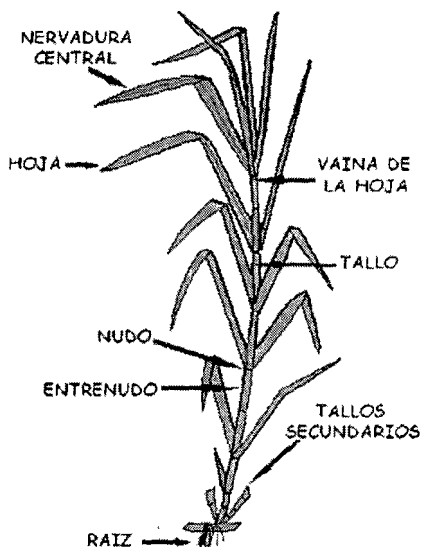


Figura 2. Representación esquemática de la caña de azúcar

La lámina es delgada, paralelinervia, con una nervadura central amplia, fuerte que termina en punta atenuada y en cuya base, enseguida del cuello, presenta dos áreas triangulares a ambos lados de la nervadura central, éstas son más transparentes y delgadas que el resto y su forma es una característica distintiva de cada cultivar. Las hojas son verdes o purpúreas, en diferentes tonos. El limbo, en ambas superficies, puede ser glabro o pubescente y sus márgenes son aserrados (Gould y Shaw, 1992).

La inflorescencia de la caña de azúcar es una panícula abierta, posee una espiguilla sésil y otra con un pedicelo corto a partir de la cual

surgen unas estructuras semejantes a pelos largos que se insertan en la base; las espiguillas se encuentran en pares en la unión de la articulación del raquis, las florecillas pueden ser completas o incompletas, la flor presenta tres estambres con anteras biloculares; el gineceo está formado por el ovario; posee un estilo doble y dos estigmas plumosos. Es frecuente la carencia de polen fértil o el desarrollo defectuoso del gineceo y en consecuencia se impide la formación de frutos (la forma común de propagación es vegetativa). El fruto es una cariósida de 3 a 4 mm de longitud de 0.65 a 0.70 mm de ancho, elipsoidal y amarillenta. (Gould y Shaw, 1992).

3.1.2.- Importancia económica y social

El cultivo de caña de azúcar se encuentra ampliamente distribuido en países con clima subtropical y tropical, adaptándose a regiones muy húmedas con precipitaciones de aproximadamente 10,000 mm al año o hasta en condiciones de extrema sequía de 250 mm, además es especialmente importante en países en desarrollo, como Cuba, en donde su economía depende principalmente de este cultivo.

Los países con mayor importancia en producción de caña de azúcar son Brasil, India, China, Estados Unidos, Australia y México. En este último el sector azucarero representa la segunda agroindustria más importante, después del maíz, la cual se encuentra distribuida en 15 estados, los más productivos son: Veracruz, Jalisco, Oaxaca, San Luis

Potosí, Sinaloa y Tamaulipas, que aportan aproximadamente el 73.4% de la producción total (INEGI, 2001).

Adicionalmente, es de resaltar la importancia social que representa esta agroindustria ya que según la Cámara Nacional de las Industrias Azucarera y Alcohólica (CNIAA), dependen de manera directa alrededor de 538,334 familias e indirectamente industrias como la de los refrescos embotellados, panadería, alimentos balanceados, papelería y maderería (INEGI, 1998).

3.1.3.- Enfermedades de importancia económica en México.

De acuerdo con lo reportado en por Flores en 1997, el cultivo de la caña de azúcar en México era relativamente sano, sin embargo en el año de 1940 se reporta por primera vez la aparición de plagas y enfermedades con daños de importancia económica, debido a la introducción indiscriminada de variedades de un país a otro como de una región a otra dentro del mismo lugar, que ocasionó que plagas y enfermedades encontraran mejores condiciones para su desarrollo. En nuestro país, se han reportado alrededor de 25 enfermedades de importancia económica, las cuales pueden ser ocasionadas por factores parasitarios y no parasitarios (Tabla 2), así como por la presencia de plagas como: la rata cañera, la tuza, la mosca pinta o salivazo, el pulgón amarillo, la chinche de encaje, el comejón y el barrenador del tallo. Este último es considerado el vector principal de la enfermedad del muermo rojo (Flores, 1985).

Tabla 2. Enfermedades de importancia económica en caña de azúcar

	Agente causal	Enfermedad y/o daño
Parasitarias	Bacterias	Escaldadura, raquitismo
	Virus	Mosaico y hoja amarilla
	Hongos	Carbón, roya, muermo rojo
No parasitarias	Factores ambientales	Daño por frío
	Deficiencias nutricionales	Mal desarrollo
	Mal drenaje de terrenos	Pudrición de raíces

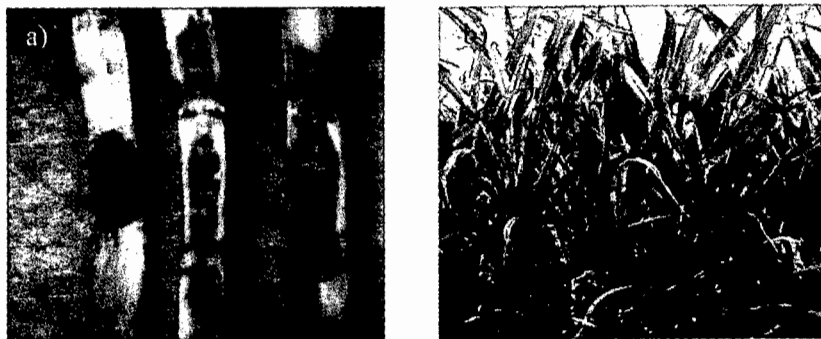
Fuente: Flores, 1997.

3.2.- MUERMO ROJO

3.2.1.- Origen y descripción

Es una enfermedad fúngica de la caña de azúcar, identificada por Went en Java, India en 1893 (Chona, 1980., Mohanraj *et al.*, 1997). En nuestro país, esta enfermedad se reportó por primera vez en 1952 en Tamaulipas, por el Instituto Nacional de la Industria Azucarera y la Dirección General de Sanidad Vegetal. El muermo rojo o pudrición roja puede presentarse en cualquier parte de la planta, más se considera como una enfermedad del tallo que se identifica por el enrojecimiento longitudinal de los tejidos que pueden interrumpir las funciones de conducción, marchitándose el follaje (Figuras 3 a y b). Cabe mencionar

que la identificación de la enfermedad es difícil sino se recurre al examen microscópico del material de estudio ya que cualquier herida, incluyendo las infecciones causadas por otras enfermedades, originan el enrojecimiento de los tejidos.



Figuras 3. Lesiones características de la enfermedad muermo rojo: (a) tallo y (b) hojas de caña (Ramírez, 2002).

3.2.2.- Impacto económico

Las pérdidas ocasionadas por esta enfermedad son reportadas en todos los países productores de caña de azúcar. Sin embargo, son de especial interés en Australia, India, Louisiana, Florida, Hawai y México; en donde el impacto económico se refleja en las variedades susceptibles (Flores, 1997).

La enfermedad del muermo trae como consecuencia una disminución en el contenido de sacarosa y un aumento en los azúcares incristalizables, lo cual afecta el proceso de cristalización del azúcar, así como el incremento o disminución en los niveles del contenido de

minerales en el jugo de caña (Tabla 3); que es proporcional a la magnitud de virulencia de las cepas y al nivel de resistencia de las variedades de caña de azúcar susceptibles y resistentes al muermo rojo (Kumar *et al.*, 1995).

En nuestro país los estados más afectados son Tamaulipas, San Luis Potosí, Veracruz y Sinaloa; en este último, los productores estiman pérdidas cercanas a los cien millones de pesos anuales (Información proporcionada por el Lic. Paez del Ingenio ELDORADO en Culiacán, Sinaloa).

Tabla 3. Efecto del muermo rojo sobre el contenido de nutrientes minerales del jugo de caña en variedades de caña de azúcar (mg/ml).

Parámetros de calidad	Variedades de caña de azúcar							
	BO 74	BO 91	BO 74	BO 91	BO 74	BO 91	BO 74	BO 91
Sacarosa	11.8	13.5	12.9	14.4	14.0	15.1	16.5	16.9
Nitrógeno	109.8	107.5	97.8	97.1	86.4	88.4	72.7	78.9
Fósforo	222.7	226.6	279.6	241.8	297.9	260.5	376.0	292.5
Potasio	5.33	7.16	5.67	7.50	6.14	7.94	7.95	9.17
Calcio	2.59	2.43	2.47	2.05	2.30	1.94	1.95	1.80
Magnesio	3.73	4.38	4.23	4.54	4.43	4.71	5.66	5.50
Zinc	1.57	1.66	1.78	1.78	1.91	1.97	2.50	2.43
Sodio	0.844	0.554	0.828	0.478	0.795	0.460	0.583	0.434

Fuente: Kumar *et al.*, 1995. BO 74 variedad susceptible y BO 91 variedad resistente.

3.2.3.- Agente causal

El muermo rojo es ocasionado por el hongo *Glomerella Tucumanensis* que en estado imperfecto recibe el nombre de *Colletotrichum falcatum*; que de acuerdo a Herrera y Ulloa (1990), pertenece a la

subdivisión Deuteromycotina, clase Deuteromycetes, subclase Coelomycetidae, orden Melanconiales y familia Melanconiaceae. Morfológicamente, presenta un micelio aéreo, blanquecino, hialino, que conforme madura toma un color salmón (Figura 4), etapa en donde se hace presente la esporulación. Las esporas son falcadas (en forma de media luna), birrefringentes, multivacuoladas, de 15 a 27 μm y, que por sus características se hace difícil su identificación con otros hongos fitopatógenos como *Fusarium* spp.

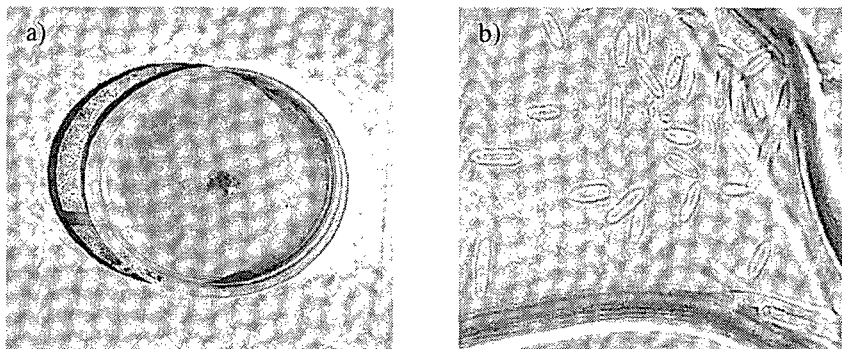


Figura 4. Características morfológicas de *C. falcatum* en agar papa dextrosa: (a) micelio y (b) conidios (Ramírez, 2002).

3.3 CRITERIOS DE IDENTIFICACIÓN

Colletotrichum es un género notoriamente diverso desde el punto de vista taxonómico, evolutivo, de especificidad del huésped y mecanismo de patogénesis, por lo que es necesario contar con una serie de criterios que

permitan realizar una diferenciación de manera inequívoca (Gutiérrez *et al.*, 2002).

3.3.1.- Morfológico

Comúnmente, la identificación y diferenciación de un microorganismo de otro, ha sido principalmente basado en criterios morfológicos, así como en la especialización del huésped y manera de parasitismo (Bailey *et al.*, 1992). Sin embargo, a pesar de que este tipo de análisis puede llegar a ser muy subjetivo y en ocasiones insuficiente, la información proporcionada es muy valiosa y más cuando se sustenta en técnicas instrumentales como Microscopia de Campo Luminoso (MCL) y Microscopia Electrónica de Transmisión (MET), que permiten conocer y/o identificar de manera más precisa, el comportamiento o desarrollo que pudiera presentar un microorganismo (de Loza *et al.*, 2002).

Cabe mencionar, que con la aplicación de este tipo de técnicas se ha podido demostrar que las estructuras de infección de las especies del género *Colletotrichum*, son las conidias y las ascosporas, las cuales se adhieren a la superficie de la planta (Perfect *et al.*, 1999; Casarrubias *et al.*, 2002).

Después de la adhesión, los conidios o ascosporas germinan, desarrollando un tubo germinativo que forma unas estructuras denominadas apresorios (Figura 5), los cuales también pueden formarse al final de un tubo germinativo como las hifas e inclusive en la ausencia de un huésped, por ejemplo cuando los conidios germinan en una superficie dura de una

caja de cultivo (Emmett y Parbery, 1975; Akinwunmi y Latunde, 2001; Casarrubias *et al.*, 2002).

Los apresorios son morfológicamente característicos en el género *Colletotrichum* y son considerados importantes en el proceso de infección. Estos son oscuros, globosos y de diferentes tamaños, lo que permite considerarlos dentro de un criterio de diferenciación; por ejemplo los apresorios de *C. lindemutianum* tienen un diámetro entre 5 y 7 μm , mientras que los de *C. graminicola* de 10 a 12 μm (Bailey *et al.*, 1992; Perfect *et al.*, 1999; Chung, 1999).

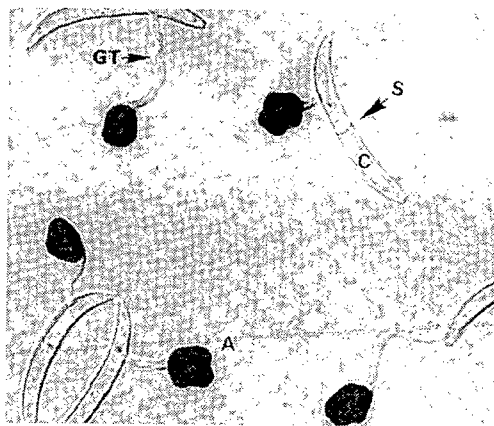


Figura 5. Micrografía de campo luminoso de apresorios de *Colletotrichum* spp. (GT) tubo germinativo, (S) septo, (A) apresorio (O'Connell *et al.*, 1985).

Durante el proceso de infección, los apresorios se adhieren a la superficie del huésped mediante interacciones hidrofóbicas, seguido de la

liberación de enzimas que degradan la pared celular, como quitinasas glucanasas y proteasas. Después de la adhesión, el patógeno se ramifica intracelularmente mediante dos mecanismos de infección: uno intramural subcuticular y otro intracelular (Figura 6). En el primero de ellos el patógeno invade los espacios intramurales del huésped causando una antracnosis en el tejido epidérmico debido a la penetración celular. En el segundo, el patógeno se adhiere y penetra al huésped hasta que el proceso de infección se desarrolla lo cual causa una antracnosis en el tejido epidérmico que puede ser tan severa que ocasiona la muerte celular (Perfect *et al.*, 1999).

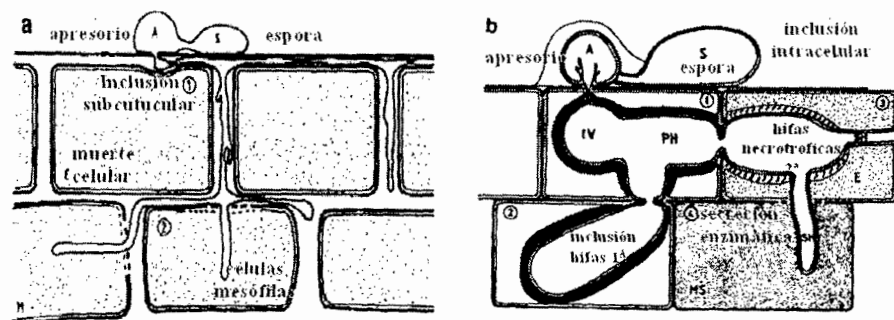


Figura 6. Esquemas del mecanismo de infección del género *Colletotrichum*: (a) infección intramural subcuticular de *C. capsisi*, (b) infección hemibiotrófica intracelular de *C. lindemutianum* (Perfect *et al.*, 1999).

Luego de que las hifas secundarias emergen del apresorio y penetran en el tejido, numerosos esporangióforos se desarrollan en la

superficie de la planta dando lugar a esporangios, así como acérvulos y peritecios (Figura 7). Tales estructuras son agregados pseudoparenquimatosos de hifas en las que se forman conidióforos los cuales producen y sostienen conidios que, posteriormente el viento disemina para infectar otras plantas. Después de haberse llevado a cabo la plasmogamia, se activan las hifas somáticas alrededor de los órganos sexuales y se forma tejido prosenquimático o pseudoparenquimatoso que va a formar el peritecio que contiene ascas y estas a su vez esporas verdaderas.

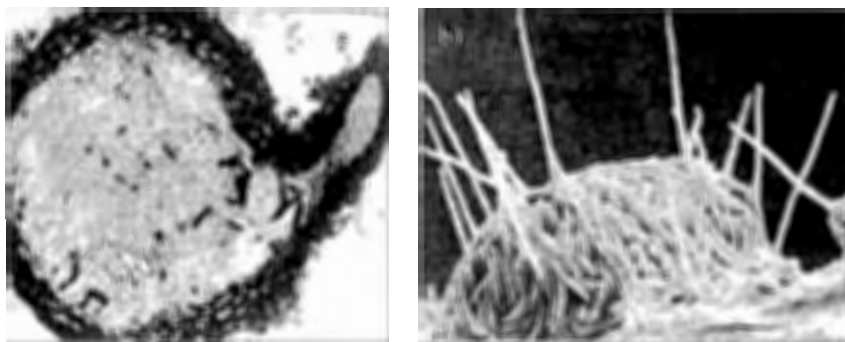


Figura 7. Micrografía electrónica de barrido: (a) peritecio *C. lindemuthianum* y (b) acérvulo de *C. graminicola* (Bailey *et al.*, 1992).

3.3.2.- Molecular

La existencia de variabilidad intraespecífica es un hecho fácilmente perceptible; los individuos no son idénticos entre sí. Esta variación surge por mutación del material hereditario, requisito necesario para que la especie evolucione y se adapte a nuevas condiciones, pues la selección no

puede actuar sino existen diversas alternativas. Sin embargo, no es fácil estimar el verdadero grado de variación genética. En principio las únicas diferencias observables entre individuos eran rasgos fenotípicos; pero la variación genética correspondiente a estas diferencias no está bien determinada, debido a que estos rasgos puedan estar controlados por varios genes, interacciones entre ellos o inclusive influenciados por el ambiente. A partir de los años sesenta, el desarrollo de técnicas para estudiar la variación a nivel molecular abrió la posibilidad de estudiar caracteres con un control genético sencillo, tales como las diferencias de movilidad en proteínas, posteriormente; se ha hecho posible estudiar directamente la variación en la molécula de ácido desoxiribonucleico (ADN) (Jiménez y Collada, 2000).

Existen dos tipos de variación genética: una diversidad neutral, es decir, que no se ve afectada por la selección natural, y una diversidad correspondiente a los caracteres con valor adaptativo. En los caracteres neutrales, las frecuencias de las diferentes variantes son consecuencias de procesos aleatorios, mientras que el mantenimiento de nuevos fenotipos surgidos por mutación depende de su valor selectivo (Cornide, 1998).

Los marcadores moleculares dan una estimación de la diversidad genética neutral. Existen distintos tipos de técnicas, que ofrecen diferente información según las características de la molécula o fragmento de molécula analizado. El fundamento de dichas técnicas consiste en detectar diferencias de tamaño, a partir de las frecuencias con que aparecen cada una de las distintas variantes (alelos) se calculan diversos parámetros que proporcionan la medida de la diversidad neutral y permiten comparaciones

entre especies y/o poblaciones. A partir de estos datos también es posible establecer relaciones de paternidad y parentesco, relaciones filogenéticas, o analizar qué procesos están ocurriendo en las poblaciones (migración, deriva genética y cuellos de botella). Los estudios con marcadores resultan relativamente baratos y, sobre todo, ofrecen resultados rápidos. De acuerdo a la tecnología utilizada, suelen distinguirse dos grandes grupos de marcadores:

- Basados en el análisis de proteínas.
- Basados en el análisis del ADN.

Además de esta división según el tipo de molécula utilizada y la técnica, los marcadores se caracterizan como haploides o diploides, dependiendo del tipo de genoma de que provengan, y como dominantes (cuando, en el caso de individuo heterocigotos, sólo es posible observar el alelo dominante) o codominante (cuando pueden distinguirse los dos alelos en heterozigosis) (Jiménez y Collada, 2000).

3.3.2.1.- Marcadores protéicos

Los marcadores proteicos o bioquímicos son generalmente codominantes, y permiten el análisis a la vez de varios *loci* con bajo costo, sin embargo, el empleo de estos marcadores se ha retrasado en relación a cultivos como el tomate, el maíz, el arroz y el trigo, entre otros. Así por ejemplo, las isoenzimas fueron los primeros marcadores moleculares discutidos en caña y los primeros trabajos estuvieron encaminados a la caracterización varietal y los estudios filogenéticos. Pero, su uso como

marcadores en la selección temprana, dentro del mapeo genético en el estudio del polimorfismo tisular para detectar variabilidad en el funcionamiento de los genes, se ha visto limitado. Las razones fundamentalmente se deben a la alta complejidad genética de las especies del género *Saccharum* spp. y en particular de los híbridos modernos resultantes de la hibridación de especies altamente poliploides, lo cual dificulta la interpretación genética de los patrones de polimorfismo resultantes; las técnicas más utilizadas son el análisis isoenzimático y la electroforesis en dos dimensiones (Cornide, 1998; Moreno, 1995).

3.3.2.2.- Marcadores de ADN

Los marcadores de ADN presentan una serie de ventajas frente a los proteicos: no se ven afectados por variaciones ambientales ni de desarrollo, muestran la base misma de la variación de los individuos, permiten seleccionar regiones concretas dentro de la molécula de ADN para estudios determinados, el número de polimorfismos detectables es teóricamente ilimitado y permiten analizar tanto la información que se expresa como la que no. En la actualidad se han desarrollado un gran número de técnicas adecuadas a diferentes situaciones (Pérez, 2001; Michelmore y Hulbert, 1987).

Los marcadores moleculares tienen diferentes características en cuanto a su tipo de herencia y dominancia; por tanto, la elección de los mismos debe hacerse de acuerdo a la información que se quiere obtener. En este sentido, al elegir la técnica a utilizar es necesario tener en cuenta si proporciona un marcador dominante o codominante, si maneja ADN

nuclear (generalmente de origen biparental) o de ADN mitocondrial de origen monoparental (materno) o de ADN de cloroplasto, también de origen monoparental (dependiendo de las especies es paterno o materno). También será necesario tomar en cuenta el costo y la dificultad de la técnica, así como la necesidad de información previa sobre la secuencia de ADN, o el uso de radioactividad (Jiménez y Collada, 2000).

El primer paso es la extracción de ADN a partir del tejido deseado. Las diferentes técnicas varían en el fragmento o fragmentos que se estudian y en la manera de aislarlo: enzimas de restricción, amplificación selectiva, o una combinación de ambos métodos. La separación de los fragmentos estudiados se realiza mediante electroforesis en geles de agarosa o acrilamida y se visualizan con diferentes técnicas de tinción (Staub y Serquen, 1996).

Técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Todas las técnicas que se describen a continuación presentan en común la utilización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Mullis *et al.*, 1986), como sistema de amplificación *in vitro* de ADN. La PCR se basa en la copia de fragmentos de un ADN molde por la acción de una polimerasa termoestable, requiere la presencia de oligonucleótidos que actúan como cebadores (*primers*). Los cebadores son fragmentos de ADN de una única hebra cuya secuencia es complementaria a la región que se va a amplificar. La reacción que tiene lugar es cíclica, de modo que el número de copias obtenidas aumentan de manera exponencial, obteniendo millones

de ellas a partir de una cantidad inicial muy pequeña de ADN (Taylor *et al.*, 2001; Staub y Serquen, 1996).

La principal diferencia entre las técnicas basadas en la PCR radica en los cebadores que se empleen, que fundamentalmente pueden ser de tres tipos: específicos (diseñados a partir de una secuencia de ADN conocida previamente y complementarios de la misma); semiespecíficos (complementarios de elementos repetidos de ADN) y arbitrarios (uno o dos cebadores cortos de secuencia arbitraria, por lo cual no requieren conocimiento previo de la secuencia de ADN) (Taylor *et al.*, 2001).

PCR-ITS Reacción en Cadena de la Polimerasa-Regiones Internas Transcritas

El diagnóstico molecular basado en la reacción en cadena de la polimerasa, requiere el uso de secuencias de ADN que sean únicas para el organismo en cuestión, resultando en una señal distintiva de éste organismo (Erlich y Arnheim, 1992). Después de varias décadas de estudio del ARN ribosomal en varios organismos, se llegó a la conclusión de que los genes que codifican para ARNr presentan varias características que los hacen ideales para el diagnóstico basado en la PCR. Estas incluyen un alto número de copias genómicas y de fácil aislamiento, lo cual conduce a una señal fuerte y el desarrollo de una rápida evaluación. Un aspecto importante, es que la mayoría del ARN del ribosoma es transcrito inicialmente como un precursor muy grande (35-54S RNAm) el cual posteriormente se transcribe en varios fragmentos durante el procesamiento para generar los ARNr maduros (Figura 8). Debido a estas características,

existen cuatro regiones espaciadoras transcritas no conservadas, dos externas (5' y 3' regiones externas transcritas "ETS") y dos regiones internas (regiones internas transcritas "ITS" 1 y 2), las cuales separan a la subunidad pequeña (18S) y la subunidad grande (28S), entre las cuales se encuentra la subunidad 5.8S. Numerosos estudios de comparación filogenética han mostrado que las secuencias maduras del ARNr son altamente conservadas a través del curso de la evolución, mientras que las regiones espaciadoras son altamente divergentes, muchas veces con una clara diferencia, aun entre especies estrechamente relacionadas (Taylor *et al.*, 2001).

De esta manera, el diagnóstico basado en la PCR toma ventaja de las características del ADNr de dos maneras: 1) por que la secuencia madura se encuentre presente en todos los organismos y es altamente conservada, éstas pueden ser usadas para el diseño de "primers" universales y amplificas estas regiones útiles de otros organismos directamente del ADN genómico sin la necesidad de una biblioteca genómica o clonación del ADN; y 2) la presencia de secuencias diferentes en los ITS aun en especies muy relacionadas, permite el diseño de "primers" altamente específicos en el diagnóstico. (Lee y Taylor, 1990).

Con estas aproximaciones y dado la alta sensibilidad de la PCR, es posible determinar la presencia de un organismo dentro de una mezcla compleja, inclusive de una manera cuantitativa. Por otro lado, es posible inferir con las secuencia maduras del ARNr relaciones filogenéticas. De esta manera, los genes que codifican para el ARNr presentan un gran potencial para el diagnóstico molecular de microorganismos.

Diferentes aislados del género *Colletotrichum* han sido identificados y diferenciados tras el diseño de primers altamente específicos mediante PCR-ITS. Sin embargo, para *C. falcatum* no se tiene reportada ninguna secuencia de ácidos nucleicos (Lee y Taylor, 1990; Brena, 2002).

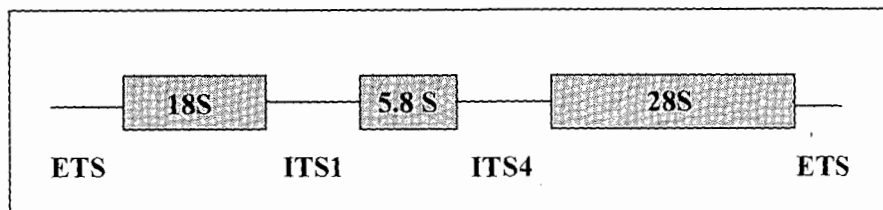


Figura 8. Esquema del arreglo de los genes de ADNr en eucariotes

3.4.- INTERPRETACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA

La mayoría de los datos obtenidos con los diferentes métodos de evaluación de la diversidad genética son cualitativos, particularmente los métodos moleculares nos dan información del tipo de datos electroforéticos de proteínas, fragmentos de restricción de ADN, perfiles electroforéticos de ADN amplificado, etc. Por lo que es necesario convertirlos en una estimación cuantitativa (Balardin *et al.*, 1997).

Esta estimación es el concepto fundamental en la evaluación de la diversidad genética en una población y es conocida como “distancia genética” que por definición, es una estimación cuantitativa de que tan divergente son genéticamente los individuos (formalmente llamados

unidades de taxonómicas operacionales o UTO's) que forman una población (Avisé, 1994).



4.- OBJETIVOS

4.1.- Objetivo General:

Identificar morfológicamente y evaluar una prueba de diagnóstico molecular mediante PCR-ITS para *Colletotrichum falcatum*.

4.2.- Objetivos Específicos:

1.- Realizar un muestreo de variedades de cañas de azúcar con lesiones características del muermo rojo en los Estados de Tamaulipas y Veracruz.

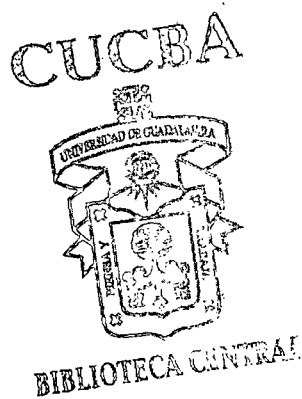
2.- Obtener cultivos monosporicos de *Colletotrichum falcatum* a partir del muestreo realizado.

3.- Identificar y diferenciar mediante microscopia de campo luminoso y electrónica de transmisión las estructuras de *Colletotrichum falcatum in vitro*.

4.- Evaluar la amplificación específica de los primers ITS1 e ITS4 por medio de PCR-ITS.

5.- HIPÓTESIS

La identificación morfológica mediante microscopía electrónica de transmisión y molecular por medio de PCR-ITS, comprueba la presencia de *Colletotrichum falcatum* en caña de azúcar.



6.- MATERIALES Y MÉTODOS

La sección experimental para su realización fue dividida en: muestreo, diferenciación morfológica, diferenciación molecular y análisis de resultados, como se muestra en el esquema de la Figura 9.

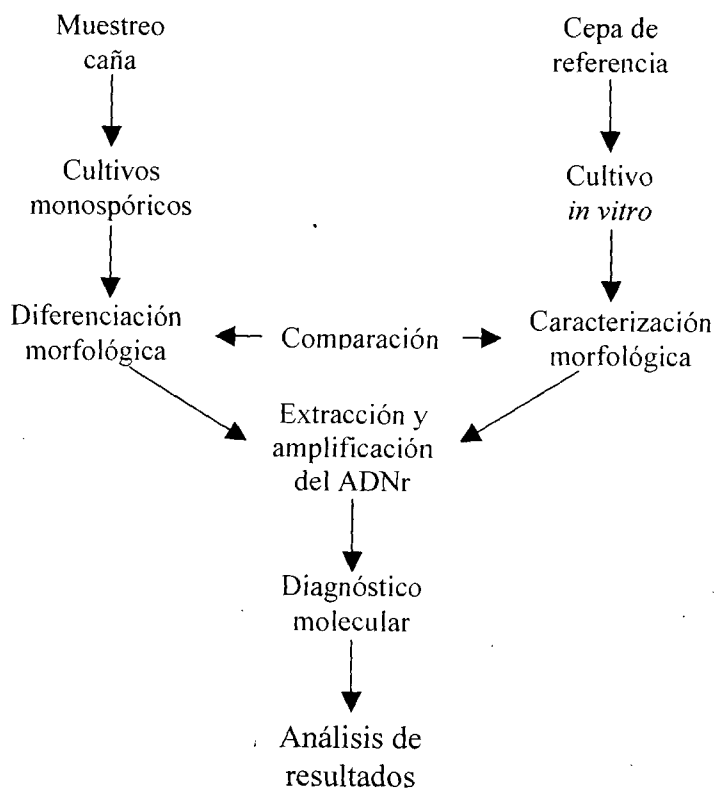


Figura 9. Esquema de la estrategia general de investigación

6.1 Muestreo

El material de estudio se obtuvo de los ingenios azucareros de El Mante, Tamaulipas y Zapoapita, Veracruz. Este consistió en cortar tallos de caña de azúcar de interés comercial con lesiones características del gusano barrenador del tallo o de la enfermedad del muermo rojo. Dichos tallos fueron identificados por variedad, cortados y almacenados para su análisis en el laboratorio.

6.2.- Diferenciación morfológica

Obtención de cultivos monospóricos

Los tallos fueron desinfectados con una solución de NaOCl al 0.52% y cortados longitudinalmente, con la finalidad de tomar pequeños fragmentos del tejido lesionado empleando un bisturí con navaja No. 3 y pinzas de disección. Dichos fragmentos se sometieron a una serie de lavados en cajas petri estériles (90 x 15 mm) empleando una solución de NaOCl 0.52 % por 5 segundos, seguido de dos lavados con agua bidestilada estéril, para eliminar el exceso de cloro. El tejido una vez desinfectado se colocó en cajas petri con agar papa dextrosa (Difco Laboratories) acidulado con 20 gotas de ácido láctico por litro (Sigma Chemical). Las cajas se sellaron con cinta adherente y se incubaron a temperatura ambiente por 48 horas en la oscuridad. Una vez transcurrido este tiempo se retransfirieron a cajas petri, esporas de cada uno de los aislados obtenidos mediante una aguja entomológica. Posteriormente se

realizaron replicas para cada uno de los cultivos identificados, transfiriendo un fragmento del medio de cultivo a tubos eppendorf con agar acidulado, y rellenos con 1 ml de aceite mineral (Sigma Chemical) para su conservación a 4 °C.

Preparación de muestras para microscopía electrónica de transmisión y de campo luminoso.

Microscopía de Campo Luminoso (MCL)

La identificación y diferenciación de *C. falcatum*, se realizó tomando como patrón de referencia una cepa certificada obtenida del Institute for Fermentation of Osaka, Japón (IFO31440B), la cual fue activada en PDA a una temperatura de incubación de 30 ± 2 °C. Los parámetros de identificación que se evaluaron *in vitro* son: el desarrollo de hifas, micelio, apresorios y estructuras de reproducción, que fueron captadas mediante un microscopio de campo luminoso trilocular (Axiostar, Karl Zeiss), que incluía un sistema de microfotografía digital (Karl Zeiss).

Microscopía electrónica de transmisión

La preparación de la muestra se realizó en base a la modificación del protocolo original propuesto por Zeyen y Bushnell (1981). Para la aplicación de esta técnica la cepa de referencia se inoculó en el medio líquido modificado de Mathur's o M3S (Tu, 1985) (1 g de extracto de levadura, 1 g de bacto peptona, 10 g de sacarosa, 2.5 g de sulfato de magnesio heptahidratado y 2.7 g de fosfato monobásico de potasio por

litro) por 48 h a 25 rpm y temperatura ambiente, para la preparación de la muestra que consistió de los siguientes pasos:

Fijación: La muestra se transfirió a un tubo de ensayo de 13 x 75 mm, con 500 μ l de glutaraldehído al 2 % (Sigma Chemical) y 500 μ l de cacodilato de sodio 0.1M (Sigma Chemical), para su impregnación en vacío (40 mmHg por 3 h). Posteriormente el material de estudio se centrifugó a 4,000 rpm por 5 min, se decantó y se realizaron 3 lavados sucesivos de 10 min cada uno, con cacodilato de sodio 0.1M seguido de una centrifugación.

Posfijación: Se adicionó a la muestra, una mezcla de tetraóxido de osmio al 1% (Sigma Chemical) en proporción 1:1 (v/v) con cacodilato de sodio 0.2 M, la cual fue cubierta con parafilm, y mezclada suavemente cada 30 min por espacio de 3 horas, nuevamente se centrifugó a 4000 rpm por 5 min y posteriormente se realizaron 3 lavados sucesivos de 10 min cada uno con cacodilato de sodio 0.1 M sin que se resuspenda la muestra. Finalmente, la muestra se resuspendió con ayuda de una micropipeta y fue colectada mediante centrifugación y decantación.

Deshidratación: A la muestra colectada se adicionó 500 μ l de etanol de manera ascendente en concentraciones de 50, 70 y 90%, se dejó reposar por 10 min en cada una de las concentraciones, por último; se adicionó en 3 ocasiones 500 μ l de etanol absoluto por 20 min el cual se decantó en cada paso.

Preparación de resina: Se utilizó un kit spurr (Sigma SPP-LU) para microscopia electrónica, el cual se adicionó a la muestra en proporción 1:1 (v/v) resina y óxido de propileno a 40 mmHg por 30 min, se decantó el tubo y nuevamente se agregó resina, manteniéndose en un agitador vertical (Pelco, USA) a 5 rpm, durante 24 h. Las muestras se transfirieron a cápsulas (Beem), a las cuales se les adicionó resina y se centrifugaron a 4000 rpm por 5 min; nuevamente se adicionó resina y se etiquetaron para su identificación. Las cápsulas se colocaron en el horno a 65 °C de 20 a 24 horas.

Elección del corte: Se rompió la cápsula de plástico con una navaja y se colocó en el ultramicrotomo (Creichert, Austria OmU3), para realizar los cortes de 90 nm de espesor. Los cortes se observaron al microscopio óptico para verificar su calidad.

Contraste: Los cortes obtenidos se colocaron en rejillas de cobre, se les adicionó 20µl de acetato de uranio por 15 min; transcurrido este tiempo se lavó con abundante agua bidestilada, se adicionó una gota de citrato de plomo por 9 min y se lavó nuevamente con abundante agua bidestilada. Posteriormente se observó al microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM 906.

6.3.- Diferenciación molecular

Extracción de ADN

A partir de los cultivos monospóricos identificados como *C. falcatum* se tomó un pequeño fragmento el cual se transfirió a 25 ml del

medio líquido M3S, que se mantuvo en agitación continua durante 72 horas a temperatura ambiente. A continuación se procedió a realizar la extracción y posterior cuantificación del ADN. El ADN de *C. falcatum* se obtuvo tomando como referencia el protocolo propuesto por Lee y Taylor en 1990. Posteriormente, se filtró a vacío el medio de cultivo que contenía el hongo y se transfirió a un mortero para su maceración en nitrógeno líquido. El macerado se transfirió a un tubo eppendorf de 2.0 ml mezclado con 800 µl de una solución amortiguadora de extracción (NaCl 250 mM, EDTA 25 mM y SDS al 0.5%), e incubado a 65 °C durante 60 min en un baño metabólico (Chromalox). Después, se adicionaron 800 µl de fenol-cloroformo (1:1, v/v), y se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 min en una centrifuga refrigerada (Eppendorf Hermle Z 233 M-2). La fase acuosa se transfirió a un tubo eppendorf de 2.0 ml donde se adicionó 400 µl de cloroformo (Sigma Chemical) y se centrifugó a 14,000 rpm por 15 min. Nuevamente la fase acuosa fue transferida a otro tubo eppendorff al cual se adicionó 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3M (Sigma Chemical) y 0.6 volúmenes de isopropanol (Sigma Chemical), a 14,000 rpm por 15 min, se realizaron dos lavados con 800 µl de etanol al 70% (Sigma Chemical), se centrifugaron a 14,000 rpm por 5 min. Se decantó el sobrenadante y se procedió a secar la muestra en el concentrador de ADN a 40 °C durante 3 min (Labconco). El precipitado fue resuspendido en 500 µl de una solución Tris-EDTA (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0, EDTA 1 mM, pH 8.0), se adicionó 5 µl de RNAsa a una concentración de 10 mg/ml (Sigma Chemical), a continuación las muestras se incubaron a 37 °C por 30 min.

Se adicionó 500 μl de fenol-cloroformo (1:1, v/v), se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min, se adicionó 0.3 volúmenes de acetato de amonio (Sigma Chemical) y 0.1 volúmenes de isopropanol (Sigma Chemical) y finalmente, se centrifugó a 14,000 rpm por 10 min, se decantó, se secó la muestra en el concentrador de ADN y se adicionó 100 μl de agua libre de pirógenos y RNAsa para su conservación a 4 °C por 24 h y posteriormente se almacenaron a -20 °C.

Cuantificación de ADN

La cantidad y la calidad del ADN fueron determinadas mediante espectrofotometría, utilizando dos longitudes de onda diferentes; una de 280 y otra a 260 nm. Los datos de absorbancia permitieron evaluar la pureza y la concentración de la muestra mediante la aplicación de las siguientes formulas:

$$\text{Pureza} = \frac{\text{lectura } 260 \text{ nm}}{\text{lectura } 280 \text{ nm}}$$

$$\text{Concentración} = \frac{(\text{Lectura } 260) (\text{Factor de dilución})}{20} = \mu\text{g} / \mu\text{l}$$

Visualización y determinación del peso molecular

La pureza del ADN fue confirmada en el gel de agarosa al 0.8 % el cual fue teñido con bromuro de etidio para su visualización en luz ultravioleta. El peso molecular de las bandas identificadas en los geles fue

determinado con la aplicación de un marcador de 100 pb como patron de comprobación.

6.4 Análisis del ADN ribosomal mediante PCR-ITS

La reacción de PCR se realizó en un volumen de reacción de 25 μ l que incluye: agua milliQ (Sigma Chemical), 2.5 μ l de buffer 10X (100mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, pH 8.0), 2.0 μ l de MgCl₂, 25 mM (Sigma Chemical), 2.0 μ l de dNTP's (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) en una concentración de 2.5 mM (Gibco Life Technologies), 0.10 mM de cada uno de los primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCTG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Ramírez, 2002), 0.5 unidades de Taq DNA polimerasa (Gibco Life Technologies) y 5 μ l de ADN en una concentración de 10 ng/ μ l. La amplificación se realizó mediante el siguiente programa: 1 ciclo de desnaturalización del ADN a 94 °C por 120 seg, seguido de 30 ciclos a 94 °C (60 seg), 55 °C (60 seg) y 72 °C (90 seg) y 1 ciclo de extensión final a 72 °C por 7 min. Los productos de la amplificación fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa a 1.2% (Gibco Life Technologies) empleando un buffer TAE al 1% y bromuro de etidio para su visualización en luz ultravioleta.

Una vez realizado el PCR se realizó una segunda amplificación de dichos productos con los iniciadores CF1 y CF2 (comunicación personal de Fernando Ramírez, Instituto Tecnológico Agropecuario de Jalisco) los

cuales se utilizaron para amplificar el fragmento terminal 3' del gen 18S ARNr y el fragmento 5' del gen 28S del ARNr.

Digestión de enzimas

A partir del producto de PCR se realizó una digestión con las enzimas, con *AccI* y *AvaI* (GIBCO) con la finalidad de poder diferenciar a *C. falacatum* de otras especies. La primera enzima realiza un corte, obteniéndose dos fragmentos uno de 394 pb y otro de 177 pb, la segunda realiza dos cortes obteniendo así tres fragmentos de 482 pb, 89 pb y 30 pb.

La reacción se realizó en un volumen total de 20 μ l para cada una de las enzimas, incluyendo: 2 μ l de buffer, 17 μ l de producto de PCR y 1 μ l de la enzima, se mantuvo en baño maría a una temperatura de 37 °C durante 16 horas. Los productos de la digestión fueron separados en un gel de poliacrilamida al 10 %, el cual contiene TBE (tris base, EDTA, ácido acético glacial)10x 1ml, se mezcló acrilamida-bis 29:1, 1.666 ml, agua destilada 2.333 ml, persulfato de amonio 10 %, 41 μ l y temed (N'N'N'-tetrametil etil nidiamina) 3.75 μ l. Por último el gel de poliacrilamida fue teñida con bromuro de etidio y visualizado con la exposición a luz ultravioleta.

7.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del muestreo realizado del 6 al 8 de marzo del 2002 en los ingenios de El Mante en Tamaulipas y Zapoapita en Veracruz, se adquirieron 22 variedades de caña de azúcar de interés comercial (C. N. I. A. A.) con lesiones características de la enfermedad del muermo rojo, de las cuales 13 se ubicaron en el estado de Tamaulipas y 9 en Veracruz (Tabla 4).

Tabla 4. Variedades de caña de azúcar de interés comercial

Estado	Ingenio	Variedades
Tamaulipas	El Mante	C331, CP, 72-2086, CP 83-1499, CP 83-1291, MEX 68 P23, NCo 310, TCP TCP 89-3498, 89-3505, YZ 89-151, YZ 81-173, LCP 8289, YZ 89-7, YZ 64-24.
Veracruz	Zapoapita	CP 70-1527, CP 72-2085, CP 72-2086, CP 82-1592, MEX 69-290, MEX 68-1345, MEX 68-P23, MEX 79-431, Q 96.

A partir de dichas variedades se obtuvieron 533 aislados monospóricos (304 de Tamaulipas y 229 de Veracruz), que fueron clasificados de acuerdo a sus características morfológicas en 7 grupos; que incluyen los géneros *Alternaria*, *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* y un grupo aún no determinado (Tabla 5 y 6).

Tabla 5. Número de aislados de hongos identificados en variedades de caña de azúcar de interés comercial en el estado de Tamaulipas.

Variedad	Alt	Asp	Coll	Fus	Pen	Trich	ND
C331	7	0	2	2	0	0	0
CP 72-2086	39	0	5	12	0	0	4
CP 83-1291	6	0	8	1	0	0	5
CP 83-1499	0	0	1	2	0	0	3
LCP 8289	1	0	1	0	0	0	4
MEX 68 P23	19	1	3	1	6	3	7
NCo 310	21	1	0	0	6	4	6
TCP 89-3498	13	0	1	1	3	0	0
TCP 89-3505	19	0	1	1	2	0	0
YZ 64-24	25	3	1	1	0	0	0
YZ 81-173	4	0	2	3	0	0	2
YZ 89-7	3	2	3	3	0	0	7
YZ 89-151	12	0	2	5	0	2	2

Alt: *Alternaria* spp., Asp: *Aspegillus* spp., Coll: *Colletotrichum* spp., Fus: *Fusarium* spp., Pen: *Penicillium* spp., Trich: *Trichoderma* spp., ND: No Determinado

Tabla 6. Número de aislados de hongos identificados en variedades de caña de azúcar de interés comercial en el estado de Veracruz.

Variedad	Alt	Asp	Coll	Fus	Pen	Trich	ND
CP 70-1527	5	0	0	0	0	0	1
CP 72-2085	17	2	0	2	1	1	3
CP 72-2086	13	0	4	5	2	5	1
CP 82-1592	8	0	5	0	0	0	0
MEX 68-1345	14	0	0	1	0	0	0
MEX 68-P23	30	4	1	5	1	2	9
MEX 69-290	31	0	4	7	0	6	3
MEX 79-431	17	0	1	12	1	1	3
Q 96	0	0	0	0	0	0	1

Alt: *Alternaria* spp., Asp: *Aspegillus* spp., Coll: *Colletotrichum* spp., Fus: *Fusarium* spp., Pen: *Penicillium* spp., Trich: *Trichoderma* spp., ND: No Determinado

Cabe mencionar que todas las variedades de caña de azúcar de interés comercial son susceptibles a la enfermedad del muermo rojo, sin

embargo en las variedades CP 331 y NCo 310 de Tamaulipas (Tabla 5) y MEX 68-1345, CP 70-1527, CP 72-2085 y Q 96 de Veracruz (Tabla 6), no se aisló *Colletotrichum falcatum* debido probablemente a los altos índices de humedad presentes en las áreas de cultivo o a la presencia de antagonistas naturales de *Colletotrichum falcatum*, como *Trichoderma* y *Penicillium*, dato que concuerda con lo reportado por Kumar en 1995, quien utilizó a nivel experimental un esquema de control biológico basado en la utilización de dichos microorganismos.

Las variedades que mostraron mayor incidencia de *C. falcatum* fueron; CP 72-2086 y CP 83-1291 en Tamaulipas (Tabla 5), así como CP 72-2086, CP 82-1592 y MEX 69-290 en Veracruz (Tabla 6).

Para realizar la identificación morfológica de *C. falcatum* fue necesario realizar una diferenciación morfológica más detallada a partir de una cepa de referencia procedente del Institute for Fermentation of Osaka, Japón. Tras dicho proceso de diferenciación *C. falcatum* se caracterizó por presentar *in vitro* y desde un punto de vista macroscópico un crecimiento micelial apical denso, que conforme maduró varió su coloración de blanco a salmón en estado juvenil y de salmón a gris oscuro, cuando el proceso de esporulación se hizo evidente (Figura 10).

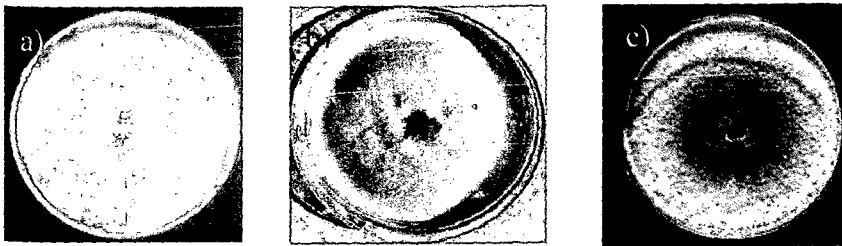


Figura 10. Diferenciación macroscópica de *C. Falcatum* en PDA; a) crecimiento apical, b) esporulación inicial, c) esporulación avanzada.

Al efectuarse las observaciones mediante microscópica de campo luminoso *in vitro*, *C. falcatum* desarrolló conidios falcados, hialinos, birrefringentes, no septados y multivacuolados, de 15 a 27 μm de longitud al igual que los reportados por Sutton en 1992 (Figura 11).

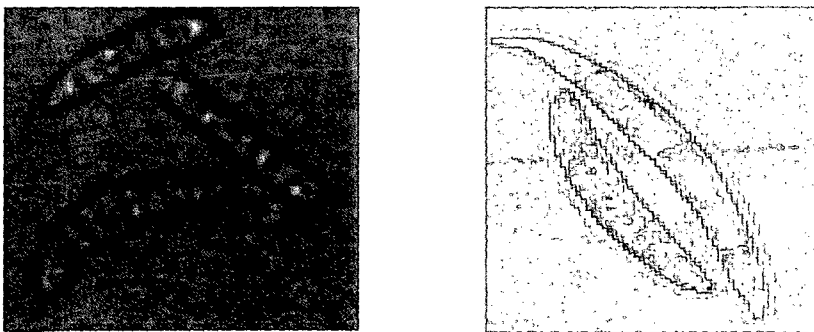


Figura 11. Vista microscópica de conidios a) *C. falcatum* en PDA, b) *Fusarium* spp. en PDA.

Es de destacar, que después de un periodo de incubación de aproximadamente 22 días a temperatura ambiente, se presentó una

disminución de nutrientes en el medio de cultivo, lo cual coincidió con la desaparición de la esporulación y con la presencia de cambios morfológicos en el micelio, de hialino birrefringente a tortuoso y septado (Figura 12), del que se desarrollaron unas estructuras globosas, oscuras, melanizadas denominadas apresorios de 9 a 12 μm de longitud, que coincide con lo reportado por Akinwunmi y Latunde en el 2001. Estas estructuras pueden observarse de manera individual o en pequeños grupos, adheridos en la parte inferior de la caja de cultivo y que se forman como parte de un mecanismo de estrés nutricional; donde el microorganismo entra en un periodo de latencia (Figura 13).

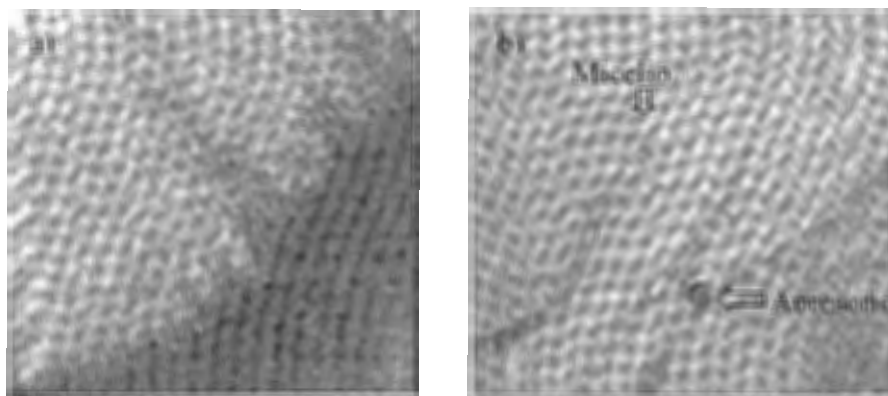


Figura 12. Vista microscópica del micelio de *C. falcatum* en PDA; a) micelio inmaduro y b) micelio maduro con apresorios.

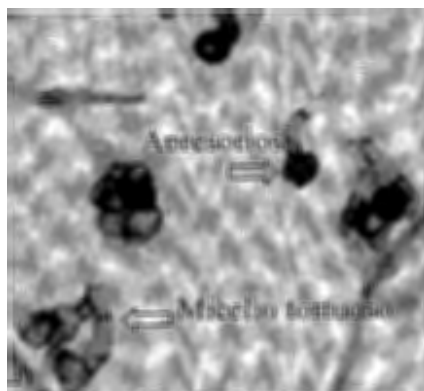


Figura 13. Apresorios característicos de *C. falcatum* en PDA.

Cuando el estrés se hace más evidente por envejecimiento del medio, aproximadamente 22 días, se observó la presencia de unos cuerpos globosos denominados picnidios, con un ostiolo en la parte anterior, conteniendo grandes cantidades de esporas o conidios asexuales (Figura 14), esto último, no se ha reportado para *C. falcatum*.

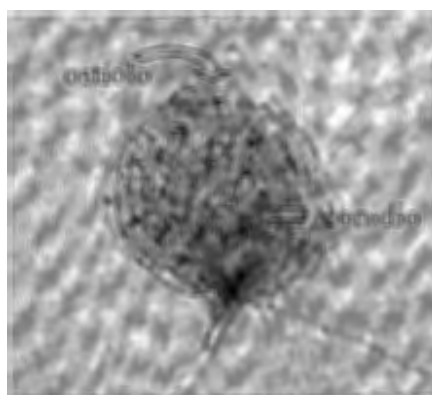


Figura 14. Picnidio de *C. falcatum* en PDA.

Bajo el estrés anteriormente mencionado y durante un periodo de tiempo más prolongado *C. falcatum* desarrolló, además de los picnidios, unas estructuras globosas que, en estado inmaduro, reciben el nombre de protoperitecios y de peritecios, en estado maduro, que se caracterizan por presentar en su interior ascas, las cuales contienen ascosporas; dando lugar al inicio de la etapa sexual del hongo, hallazgo que se corroboró con la presencia de ascas (Figura 15). Lo anterior coincide con lo reportado por Sutton (1992) y por Herrera y Ulloa (1990) para el género *Glomerella*, el cual se considera el estado perfecto del género *Colletotrichum*.

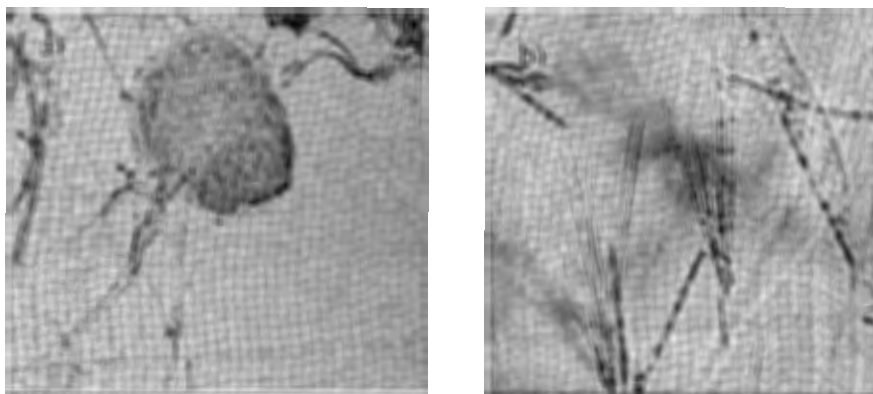


Figura 15. Estructuras sexuales de *C. falcatum* en estrés nutricional en PDA; a) protoperitecio, b) ascas.

Las pruebas que se realizaron para la caracterización morfológica de *C. falcatum* mediante Microscopía Electrónica de Transmisión hasta el momento solo han permitido observar conidios e hifas, así como las características estructurales que estas presentan como es la presencia de

pared celular, vacuolas, cuerpos lipídicos, septos, conidióforos. Con el apoyo de la modificación de la técnica propuesta por Zeyen y Rushnell (1981), el presente avance conlleva a la identificación más específica de *C. falcatum* *in vitro* (Figura 16).

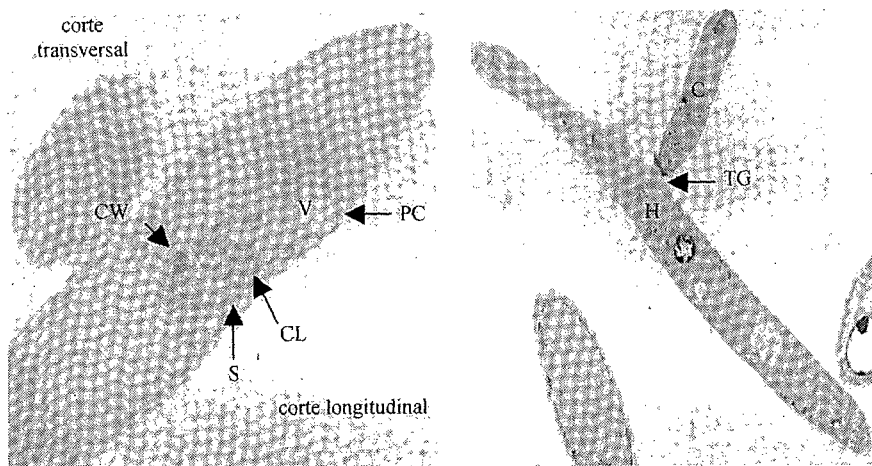


Figura 16. Microfotografía de conidios de *C. falcatum*. (PC) Pared celular, (CL) Cuerpo Lipídico, (V) Vacuola, (S) Septo, (CW) Cuerpo de Woronin, (H) Hifa, (TG) Tubo Germinativo (C) Conidio.

La información anteriormente mencionada, permite proponer el ciclo biológico de reproducción sexual y asexual de *Colletotrichum falcatum* y que se resume en el siguiente esquema (Figura 17).

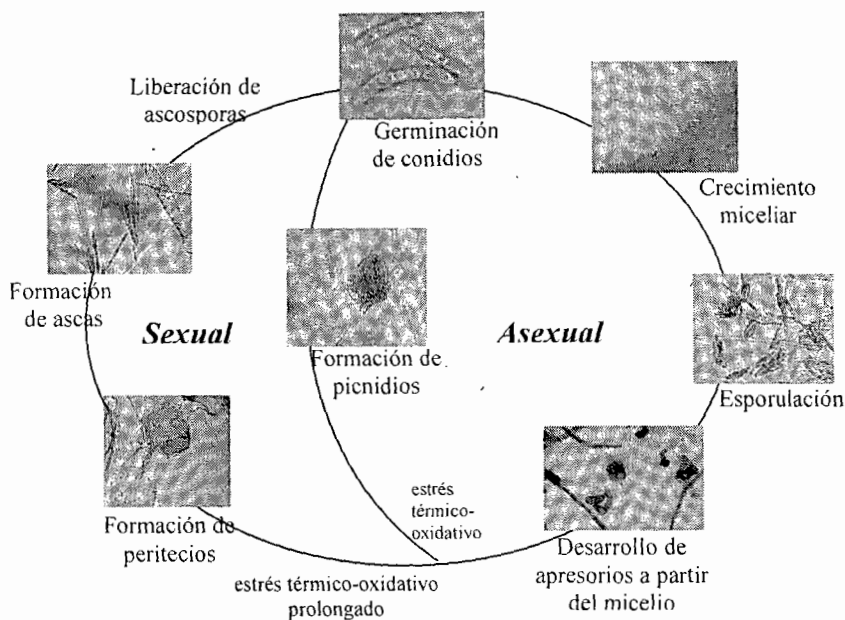


Figura 17. Descripción del ciclo biológico sexual y asexual de *C. falcatum*.

Con base a las características morfológicas de los aislados obtenidos e identificados como *C. falcatum* se procedió con la diferenciación molecular que se inició con la determinación de la calidad y cantidad del ADN extraído de los 45 aislados, tomando como referencia la cepa control (CR).

Respecto a la calidad del ADN de los aislados de *C. falcatum* con y sin RNAsa; la pureza se ubicó dentro de un rango óptimo de 1.8 a 2.0. Un valor menor a 1.8 indica la presencia de grupos aminos, alcoholes o aldehídos. Por otra parte valores mayores a 2.0 indican la presencia de carbohidratos, lo anterior permite verificar la eficiencia del tratamiento y

calidad del ADN de la muestra; tal como se puede observar en las tablas 7 y 8 donde se muestran ejemplos de la pureza y concentración de cinco aislados obtenidos de las variedades de caña de azúcar CP 72-2086 (G), MEX 69-290 (I), MEX 79-431 (J y N), MEX 68-1345 (K) en Veracruz y CP 83-1291 (3 y 8), Yz 89-7 (14), Yz 81-173 (13) y CP 72-2086 (20) en Tamaulipas.

Tabla 7. Pureza del ADN de *C. falcatum*, con y sin RNAsa en los aislados de Veracruz

Aislados	Sin RNAsa		Con RNAsa	
	Pureza	Concentración $\mu\text{g} / \mu\text{l}$	Pureza	Concentración $\mu\text{g} / \mu\text{l}$
G	1.5128	0.439	1.8641	0.7333
I	1.3720	0.2305	1.8140	0.7465
J	1.4935	0.3645	1.1815	0.4645
K	0.6236	1.925	1.9327	1.9675
N	1.7772	0.8367	1.9833	1.979

Tabla 8. Pureza del ADN de *C. falcatum*, con y sin RNAsa en los aislados de Tamaulipas

Aislados	Sin RNAsa		Con RNAsa	
	Pureza	Concentración $\mu\text{g} / \mu\text{l}$	Pureza	Concentración $\mu\text{g} / \mu\text{l}$
3	1.75	1.362	1.88	1.902
8	1.9	0.078	2.0	1.485
13	1.76	1.112	1.84	2.445
14	1.76	0.801	1.9	1.587
20	1.49	0.818	1.84	1.246

Los datos de pureza se confirmaron cualitativamente en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio y visualizado con luz ultravioleta (Figura 18), indicando claramente la presencia del ADN, además de las diferencias existentes en los tratamientos.

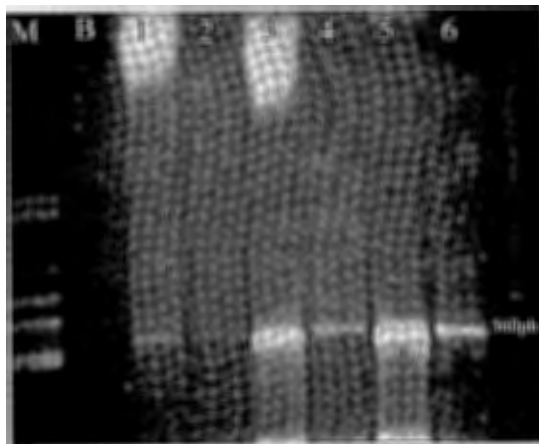


Figura 18. Análisis del ADN de *C. falcatum* en agarosa 0.8 %. Carril M. marcador de peso molecular 100 pb; B. Blanco; 1, 3 y 5. ADN de los aislados G, 3 y CR (cepa de referencia) sin RNAsa; 2, 4 y 6 ADN de los aislados G, 3 y CR con RNAsa.

Los productos de extracción y purificación (con RNAsa) de los aislados de *C. falcatum* que se sometieron a la amplificación selectiva de las regiones ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCTG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') mediante PCR, se identificaron cualitativamente en un gel de agarosa y en base al marcador de 100 pb se estableció que el peso molecular promedio de la región de interés es de

aproximadamente 560 pb (Figura 19), que coincide con lo reportado por Ramírez en el 2002.

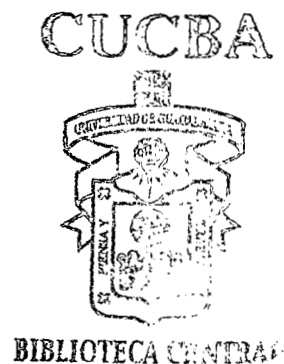
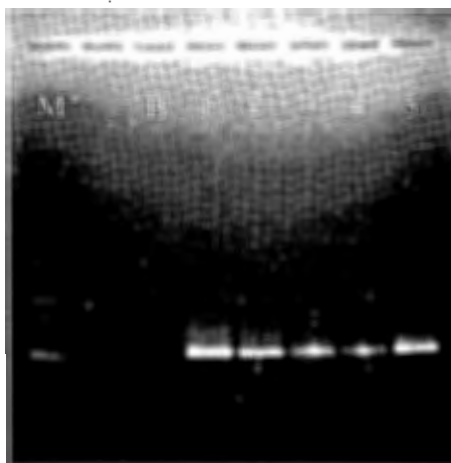


Figura 19. Análisis en agarosa 1.2 %, de productos de PCR de ADN de *C. falcatum* amplificados con ITS1 e ITS4. Carriles M. Marcador de peso molecular 100 pb; B. Blanco; 1- 4 Aislados de *C. falcatum*, 5. CR.

De la segunda amplificación de PCR, con los iniciadores CF1 y CF2, los cuales fueron diseñados tras un trabajo de secuenciación de la cepa de referencia en el Instituto Tecnológico Agropecuario de Jalisco (Ramírez, 2002), con la intención de contar con una amplificación selectiva de *C. falcatum*, observaron que los iniciadores no mostraron especificidad, debido a que amplificaron otros géneros como *Fusarium*, *Alternaria*, *Trichoderma* y *C. gloeosporoides*. Posteriormente se realizó un análisis de los sitios de restricción del ADN ribosomal de la cepa secuenciada de *C.*

falcatum (AF487427), la cual se comparó con otras 23 especies relacionadas genéticamente, de los géneros *Colletotrichum* y *Fusarium* por Brena en el 2002.

Con base a los resultados obtenidos por Brena (2002) y Ramírez en el 2002, se realizó el análisis de restricción con las enzimas *Acc I* y *Ava I* empleadas en la cepa de referencia de *C. falcatum*, las cuales presentaron especificidad para la región de interés, donde se obtuvieron fragmentos de 184 y 394 pb para *Acc I* y de 30, 89 y 452 pb para *Ava I* (Figura 20), sin embargo; cuando se utilizaron en los aislados identificados morfológicamente como *C. falcatum* sólo la enzima *Acc I*, presentó la región de interés (Figura 21).

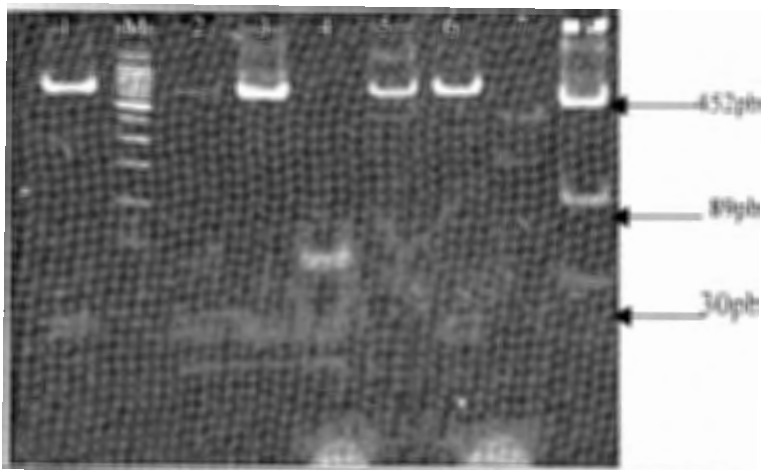


Figura 20. Análisis de la digestión enzimática de los productos de PCR – ITS de *C. falcatum* mediante *Ava I* en gel de poliacrilamida al 10 %. Carriles M. Marcador de 100 pb; 1 al 7 aislados de *C. falcatum*. P. Plásmido de la cepa de referencia.

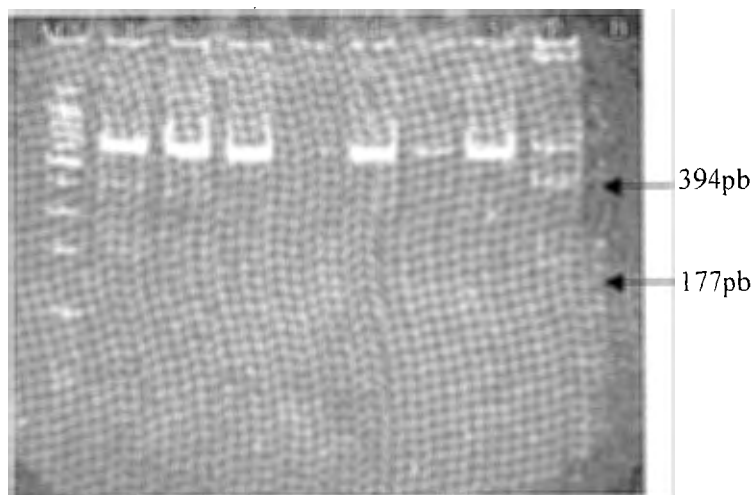


Figura 21. Análisis de la digestión enzimática de los productos de PCR – ITS de *C. falcatum* mediante *Acc I* en gel de poliacrilamida al 10 %. Carriles M. Marcador de 100 pb; 1 al 5 aislados de *C. falcatum*. P. Plásmido de la cepa de referencia, B. Blanco.

8.- CONCLUSIONES

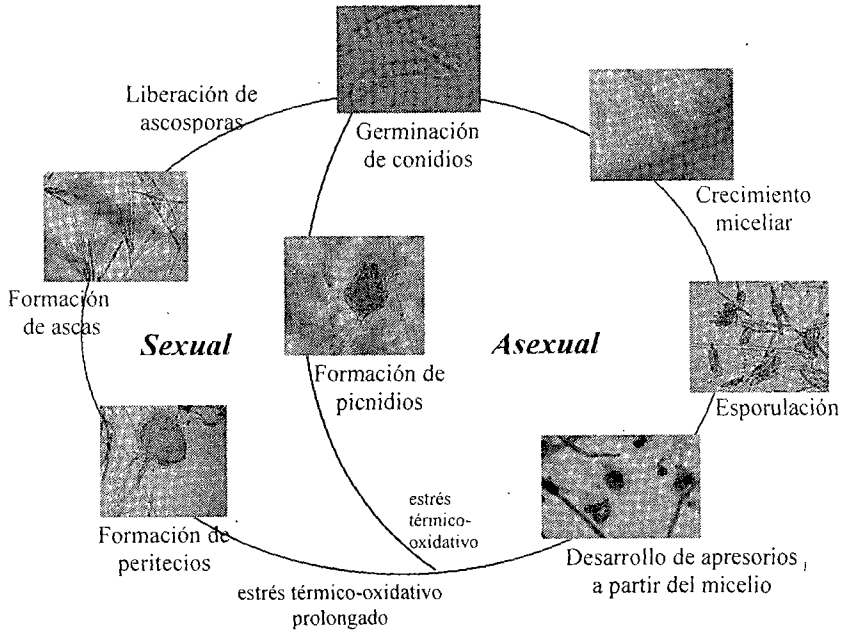
1.- Se muestrearon 22 variedades de caña de azúcar de los cuales se obtuvieron 533 aislados que actualmente conforman un banco de cepas distribuidos en 7 grupos que incluyen a los géneros *Alternaria* (304), *Fusarium* (64), *Colletotrichum* (45), *Aspergillus* (13), *Trichoderma* (24), *Penicillium* (22), y un grupo aún no identificado (61).

2.- Con base a la modificación de la técnica utilizada por Zeyen y Bushnell en 1981; se identificó y diferenció a *Colletotrichum falcatum*, mediante microscopía electrónica de transmisión.

3.- Se extrajo ADN de 45 aislados identificados morfológicamente como *C. falcatum*.

4.- Los iniciadores ITS1 e ITS4 amplificaron correctamente las regiones transcritas internas del ADN ribosomal de *Colletotrichum falcatum*, lo cual se respalda con la digestión enzimática de *Acc1* y *Ava1* que reconocen los sitios de restricción de la cepa de referencia.

Adicionalmente, mediante el empleo de la microscopía de campo luminoso, se describió el siguiente ciclo biológico para *Colletotrichum falcatum*.



Descripción del ciclo biológico sexual y asexual de *C. falcatum*.

9.- BIBLIOGRAFÍA

Avise J. C. 1994. Molecular markers, natural history & evolution. Edit. Chapman & Hall Inc. Nueva York. pp 1 – 5, 10.

Akinwunmi O. y Latunde D. 2001. *Colletotrichum*: tales of forcible entry, stealth, transient confinement and breakout. Molecular Plant Pathology. 2(4): 187 - 198.

Balardin S. R., Jarros A. M. y Kelly J. D. 1997. Virulence and molecular diversity in *Colletotrichum lindemuthianum* from South, Central, and North America. Phytopathology. 87(12): 1184 - 1191.

Bailey A. y Jeger J. 1992. *Colletotrichum*: Biology, pathology and control. British Society for Plant Pathology, C.A.B. International. Londres, Inglaterra. 388 p.

Bailey A., O'connell R., Pring R. y Nash C. 1992. Infection strategies of *Colletotrichum* species. En: *Colletotrichum*: Biology, pathology and control. Edit. Sociedad Británica para Fisiología de Plantas. Londres, Inglaterra. pp 88 - 120.

Brena B. 2002. Caracterización morfológica mediante microscopía de campo luminoso y electrónica de transmisión de *Colletotrichum falcatum* Went., molecular mediante PCR-ITS y análisis de restricción de ADN

ribosomal amplificado (ARDRA). Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico Agropecuario de Jalisco. 95 p.

Casarrubias C., Cárdenas S., Nieto A. y Gutiérrez A. 2002. Histopatología de frutos de papaya (*Carica papaya* L.) infectados por *Colletotrichum gloeosporoides* Penz. Revista Mexicana de Fitopatología. 20(1): 88-93.

Chona B. 1980. Red rot of sugarcane and sugar industry-a review. Inidan Phytopathology. 33:191 - 206.

Comisión Nacional de la Industria Azucarera y Alcoholera. 1975. Veinte Años de investigación cañera en México. IMPA libro 8. CNIA. México, D. F. pp 39 - 56.

Cornide M. 1998. Caracterización de un grupo de clones del complejo *Saccharum* y de germoplasma básico de interés para el mejoramiento cañero mediante RFLP. Tesis de Maestría en Biología Vegetal. Centro Nacional de Investigaciones Científicas. pp. 2 - 9, 12 - 20.

de Loza M., Villalobos A., Mora G., Brena B., De la Cruz C., Gomez L. y Ramírez C. 2002. Caracterización morfológica de *Colletotrichum falcatum* mediante microscopia de campo luminoso y electrónica de transmisión. Memorias del XIII Congreso nacional de investigación y desarrollo tecnológico agropecuario. Guadalajara, Jal. México. pp 89.

Emmett R. y Parbery D. 1975. Apresoría. Annual review of Phythopatology. 13: 147 – 167.

Erlich H., y Arnheim N. 1992. Genetic analysis using the polimerase Chain reaction. Annual Review of Genetic. Estados Unidos de América. 26: 479-506.

Flores C. S. 1985. Las plagas de la caña de azúcar en México. Edit. C N I A A. México D. F. pp 176 – 201.

Flores. C. S. 1997. Las enfermedades de la caña de azúcar en México. Edit. C N I A A. México, D. F. pp 1, 2, 57, 113 - 120.

Gould W. y Shaw B. 1992. Gramíneas, clasificación sistemática. Edit. A.G.T.S.A. México, D. F. pp 110, 131, 239.

Gutiérrez A., Nieto A., Téliz O., Zavaleta M., Vaquera H., Martínez D. y Delgadillo S. 2001. Características de crecimiento germinación, esporulación y patogenicidad de aislamientos de *Colletotrichum gloeosporoides* Penz. obtenidos de frutos de mango (*Mangifera ndica* L.). Revista Mexicana de Fitopatología. 19 (1): 8 – 12.

Gutiérrez A., Nieto A., Gutiérrez A. 2002. Características morfológicas, culturales y patogenicidad de aislamientos de *Colletotrichum* spp.

obtenidos de frutos de guayaba (*Psidium guajava* L.). Revista Mexicana de Fitopatología. 20 (1): 24 – 30.

Herrera T. y Ulloa M. 1990. El reino de los hongos. Edit. Universidad Autónoma de México. México, D. F. pp. 173-180, 196-205.

Humbert Roger P. 1984. El cultivo de la caña de azúcar. Edit. CONTINENTAL, S.A. de C. V. México, D. F. pp 46 – 54.

INEGI. 1998. Generalidades sobre el cultivo. En: Análisis a nivel nacional de la producción de caña de azúcar. Edit. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Aguascalientes, Ags. México. pp 1 - 115.

INEGI. 2001. El sector alimentario en México. Edit.. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Aguascalientes, Ags. México. pp 22 - 84.

Jiménez P. y Collada C. 2000. Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y su uso en los programas de conservación. Agrociencia. México, D. F. 24: 10 – 14.

Kumar S., Singh N., Dwivedi N. y Kumar V. 1995. Changes in chemical composition of cane juice due to pathotypes of red-rot pathogen. Bharatiya Sugar. 12: 33 - 39.

Lee S. y Taylor J. 1990. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores in PCR protocols. Academic Press. 1: 174 – 177.

Michelmore R. y Hulbert S. 1987. Molecular markers for genetic analysis of phytopathogenic fungi. *Phytopatology*. 25:383 - 404.

Mohanraj D., Padmanaban P., Viswanathan R. y Alexander K. 1997. Sugarcane screening for red rot resistance. *Sugar Cane*. India. 3: 18 - 23.

Morales G. J. 1996 Caracterización cultural, morfológica patogénica y molecular de *Colletotrichum gloeosporoides* Penz. causante de la antracnosis del aguacate en Michoacán. Tesis de Maestría en Ciencias en Biotecnología. Colegio de Postgraduados, Montesillo, Estado de México. 96 p.

Moreno G. J. 1995. Marcadores moleculares en la mejora genética de plantas. *Revista Latinoamericana de Ciencia*. 18: 1 - 5.

Mullis K. B., Faloona F. A., Sharf S., Saiki R., Horno G. y Erlich H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro. The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol*. 51:263 - 273.

Nelson E. P. 2001. *Fusarium*. Edit. APS PRESS. Minnesota, USA. pp 1.- 23, 24 - 69.

O'Connell R., Bailey J. y Richmond D. 1985. Cytology and Physiology of infection of *Phaseolus vulgaris* by *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiological Plant Pathology*. 27: 75 – 98.

Olufalaji D. B. 1994. Cultural condition for growth and sporulation of *Colletotrichum falcatum* sugarcane red-rot fungus. *Cryptogamie, Mycology*. 3:207 - 218.

Pandey S., Tripathi R. C., Singh A. K., Shukla U. S. y Agnihotri V. P. 2000. Inheritance of resistance to red rot. Evaluation of parental clones of *Saccharum* species against red rot pathogen (*Colletotrichum falcatum* Went). *Indian Journal Genetic*. 60(2): 221-225.

Pérez Enciso M. 2001. Aplicaciones de la genética molecular a la mejora de la calidad. Centro UdL-IRTA. Roviria. pp 1 - 5.

Perfect S., Bleddyn H. y O'onnell R. 1999. Review. *Colletotrichum*: A model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. *Fungal Genetics and Biology*. 27: 186 - 198.

Ramírez Cervantes F. 2002. Caracterización molecular de aislados de *Trichoderma* spp. de caña de azúcar como agentes de control biológico de *Colletotrichum falcatum* Went. Tesis de Doctorado en Ciencias de los Alimentos. Instituto Tecnológico de Veracruz. Ver., Veracruz. México. 68 p.

Riess H. Carlota Ma., Flores Cáceres S. 1976. Catálogo de plagas y enfermedades de la caña en México. Edit. Comisión Nacional de la Industria Azucarera, Instituto para el Mejoramiento de la Producción de Azúcar. México. Pp. 12 – 25.

Staub J. y Serquen F. 1996. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. Hort Science. 31 (5): 729 – 740.

Sutton B. C. 1992. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. Biology, pathology and control. Edit. British society for plant pathology. International Mycological institute. Kew, Surrey. Pp.1 - 26.

Taylor E., Bates J., Kenyon D., Maccaferri M. y Thomas W. 2001. Modern molecular methods for characterization and diagnosis of seed-borne fungal pathogens. Journal of Plant Pathology. 83(2): 75 – 81.

Tu J. C. 1985. An improved Mathur's medium for growth, sporulation, and germination of spores of *Colletotrichum lindemuthianum*. Microbios. 44: 87 - 93.

Ulloa Miguel y Herrera Teófilo. 1994. Etimología e iconografía de géneros de hongos. UNAM. México, D. F. Pp. 110 – 112, 146.

Viswanathan R., Mohanraj D. y Padmanaban P. 1998. Comparison of three methods for evaluation of resistance to red rot caused by *Colletotrichum falcatum* in sugarcane (*Saccharum officinarum*). Indian Journal of Agricultural Sciences. 68:226 - 230.

Wharton P. S., Julian A. M. y O'Connell R. J. 2001. Ultrastructure of the infection *Sorghum bicolor* by *Colletotrichum sublineolum*. Phytopatology. 91 (2): 149 - 158.

Zeyen R. y Bushnell W. 1981. An in block, light microscope viewing procedure for botanical, materials in plastic embedments; with emphasis on location and selection of host cell-microbe encounter sites. Can. Journal of Botanical. 91: 397 - 202.