



**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

---

**Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias**

**Caracterización morfológica y  
molecular de *Pestalotiopsis* spp.  
asociado a cáncer de tallo de  
arándano  
(*Vaccinium corymbosum* L.)  
en el occidente de México**

**Tesis**

**que para obtener el grado de**

**Maestra en Ciencias en Biosistemática  
y Manejo de Recursos Naturales y  
Agrícolas**

**Presenta**

**Mónica Lorena Limón Corona**

**Zapopan, Jalisco**

**Noviembre 2017**



**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

---

**Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias**

**Caracterización morfológica y molecular de  
*Pestalotiopsis* spp. asociado a cáncer de tallo  
de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) en  
el occidente de México**

**Tesis**

**que para obtener el grado de**

**Maestra en Ciencias en Biosistemática y Manejo  
de Recursos Naturales y Agrícolas**

**Presenta**

**Mónica Lorena Limón Corona**

**DIRECTOR**

**Dr. José Pedro Castruita Domínguez**

**Zapopan, Jalisco**

**Noviembre 2017**



# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

**Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias**

**Caracterización morfológica y molecular de *Pestalotiopsis* spp.  
asociado a cáncer de tallo de arándano (*Vaccinium  
corymbosum* L.) en el occidente de México**

Por

**MÓNICA LORENA LIMÓN CORONA**

**Maestría en Ciencias en Biosistemática y Manejo de Recursos  
Naturales y Agrícolas**

Aprobado por:

\_\_\_\_\_  
**Dr. José Pedro Castruita Domínguez**  
Director de Tesis e integrante del jurado

\_\_\_\_\_  
**Fecha**

\_\_\_\_\_  
**Dr. Gil Virgen Calleros**  
Asesor del Comité Particular e integrante del jurado

\_\_\_\_\_  
**Fecha**

\_\_\_\_\_  
**Dr. Fernando Santacruz Ruvalcaba**  
Asesor del Comité Particular e integrante del jurado

\_\_\_\_\_  
**Fecha**

\_\_\_\_\_  
**Dra. Martha Isabel Torres Morán**  
Asesor del Comité Particular e integrante del jurado

\_\_\_\_\_  
**Fecha**

\_\_\_\_\_  
**Dra. Patricia Zarazúa Villaseñor**  
Sinodal e integrante del jurado

\_\_\_\_\_  
**Fecha**

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Fitopatología del Departamento de Producción Agrícola y en el Laboratorio de Interacción Planta Patógeno del Departamento de Ecología, en el Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara, ubicado en Camino Ramón Padilla Sánchez No. 2100 Nextipac, Zapopan, Jalisco, México. Bajo la dirección del Dr. José Pedro Castruita Domínguez y las asesorías del Dr. Gil Virgen Calleros, la Dra. Lucila Méndez Morán, el Dr. Fernando Santacruz Ruvalcaba, la Dra. Martha Isabel Torres Morán y la Dra. Patricia Zarazúa Villaseñor. El presente trabajo formó parte del Proyecto: “**Manejo integrado de plagas y enfermedades en berries**”.

## RESUMEN

En México el cultivo de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) ha cobrado relevancia debido a la demanda mundial, actualmente se cultivan alrededor de 3207 hectáreas, de las cuales el 73% se concentra en el occidente del país. Una de las enfermedades recurrentes que afectan a esta planta, es el cáncer de tallo principalmente asociado a *Pestalotiopsis* spp. El objetivo del presente trabajo fue determinar la asociación de *Pestalotiopsis* spp. al cáncer de tallo, así como caracterizar morfológica y molecularmente aislados provenientes de Jalisco, Colima y Michoacán. Para lo cual se colectaron 204 plantas enfermas y se obtuvieron 68 aislados de *Pestalotiopsis* spp. Los aislados se caracterizaron por la presencia de micelio blanco, algodonoso y con abundantes acérvulos. Los conidios presentaron cinco células versicólicas, tres ornamentaciones apicales y una basal. La longitud de los conidios fue de 23.5  $\mu\text{m}$  por 7.1  $\mu\text{m}$  de ancho. El análisis de componentes principales de las variables morfológicas mostró la formación de tres grupos, uno de los cuales corresponde sólo a aislados de Jalisco, mientras que los dos restantes no tienen relación con el origen de aislamiento. Se llevaron a cabo pruebas de patogenicidad con 13 aislados de *Pestalotiopsis* spp. y uno de *Fusarium* sp., se inocularon tallos de plantas de arándano variedad Biloxi de un año de edad. Después de cinco días de la infección, se determinó la presencia de tejido necrótico y de acérvulos, lo que sugiere la asociación de este microorganismo con el cáncer de tallo. Posteriormente se realizó la extracción de ADN de 34 aislados fúngicos para su caracterización molecular mediante Inter Secuencias Simples Repetidas. Se utilizaron ocho pares de oligonucleótidos y se obtuvieron 135 fragmentos de 200 a 4000 pb, el nivel de polimorfismo fue de 81.5%. Finalmente, se construyó la matriz de presencia o ausencia de bandas, a la cual se analizó la similitud por medio del coeficiente de Jaccard y se realizó el dendrograma mediante el agrupamiento UPGMA, a partir del cual se determinó la presencia de cuatro grupos dentro de la población de estudio que no presentan relación con el origen de aislamiento.

## **DEDICATORIA**

A mis padres Antonio y Ma. Guadalupe por sus enseñanzas, apoyo y consejos.

A mis hermanos Benjamín, Elena, David y Ricardo por compartir conmigo tantas experiencias únicas.

A mis abuelos Cecilia, Félix y Rafaela por su cariño y apoyo incondicional.

A mis sobrinos Luis, Ximena, Daniela y Geraldine por las sonrisas que compartimos en todo momento.

A mis amigos Caro, Víctor, Liz y David porque siempre han estado ahí para apoyarme... juntos en las buenas y en las malas.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al CONACYT por el apoyo económico brindado durante la realización de este proyecto.

Agradezco a la Universidad de Guadalajara y al CUCBA por permitirme llevar a cabo los estudios de maestría.

Agradezco a mi director de Tesis el Dr. José Pedro Castruita Domínguez por sus enseñanzas, disposición, paciencia y apoyo en todo momento, ya que sin ello no hubiera podido terminar en tiempo y forma el proyecto de investigación.

Agradezco al Dr. Gil Virgen Calleros por el apoyo brindado durante toda la maestría y sobre todo por el conocimiento compartido a lo largo de estos 9 años.

Agradezco a la Dra. Lucila Méndez Morán por su apoyo antes de comenzar la maestría y los conocimientos que compartió conmigo.

Agradezco al Dr. Fernando Santacruz Ruvalcaba por su paciencia, por todas las enseñanzas y los sabios consejos que me dio a lo largo de la maestría.

Agradezco a la Dra. Martha Isabel Torres Morán por el apoyo y las valiosas enseñanzas que compartió conmigo.

Agradezco al Dr. Octavio Martínez de la Vega por el apoyo brindado en el análisis de resultados.

Agradezco al Dr. Juan Florencio Gómez Leyva por facilitarme los oligonucleótidos para la realización de la caracterización molecular.

Agradezco al M. en C. Pablo Torres Morán por su valiosa asesoría en la parte estadística, ya que sus consejos me dieron mucha seguridad para defender los modelos estadísticos que apliqué.

Agradezco a todos mis profesores durante este proceso formativo por compartir sus conocimientos y enseñanzas, en especial a la Dra. Patricia Zarazúa Villaseñor por el apoyo en el análisis estadístico.

Agradezco enormemente a mi familia, es especial a mis padres y hermanos por su apoyo y comprensión, ya que muchas veces tuve que ausentarme de los compromisos familiares debido al trabajo que tenía en el laboratorio.

Agradezco a mis abuelos porque siempre han creído en mí, por los consejos que me han brindado y por compartir conmigo sus experiencias de vida.

Agradezco a mi amigo David Rumayor Carrillo por todo el apoyo, enseñanzas y cariño brindado a lo largo de esta travesía.

Agradezco a mi amigo Ángel Cuevas Moreno por estar conmigo durante el segundo año de la maestría.

Agradezco a todos mis amigos del laboratorio, Nancy, Gris, Alma, Carla, Hilda, Checo, Vanesa, Memo, Melanie, Fernando, Abdil, Paola, Marisela, Noé, Arlyn y Osbaldo porque siempre hacían más llevaderas las largas jornadas de trabajo.

Agradezco a todos mis compañeros de la maestría de la generación 2015B en especial a Adriana, Lulú, Yeye y Beto por los buenos momentos que compartimos y por qué no, también los de estrés.

Agradezco a mis mejores amigos Caro, Víctor y Liz por los consejos, el apoyo, las experiencias inolvidables y sobre todo por escucharme en los momentos más difíciles.



Agradezco a todos los productores de arándano que nos permitieron la entrada a sus predios, en especial a Don Rafa y a la Sra. Elizabeth por todo el apoyo brindado y que gracias a eso gran parte del proyecto se pudo llevar a cabo.

Agradezco enormemente a Violeta Aspeitia Echegaray y a la empresa Especialistas en Papayas S.A. de C.V. por las donaciones de plantas para llevar a cabo este proyecto.

Agradezco a todas las personas que me apoyaron directa o indirectamente para la realización de este proyecto.

## ÍNDICE DEL CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS .....	iii
ÍNDICE DE CUADROS .....	vii
ABREVIATURAS .....	viii
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES .....	3
2.1. Arándano ( <i>Vaccinium corymbosum</i> L.) .....	3
2.1.1. Situación actual del cultivo de arándano en México.....	4
2.2. Enfermedades que afectan el arándano .....	5
2.2.1. Cáncer de tallo.....	6
2.2.1.1. <i>Botryosphaeria corticis</i> .....	7
2.2.1.2. <i>Neofusicoccum</i> spp.....	8
2.2.1.3. <i>Phomopsis vaccinii</i> .....	9
2.2.1.4. <i>Pestalotiopsis</i> spp.....	10
2.2.1.4.1. Taxonomía de <i>Pestalotiopsis</i> .....	12
2.3. Marcadores moleculares: ISSR.....	14
3. JUSTIFICACIÓN .....	16
4. HIPÓTESIS .....	17
5. OBJETIVOS .....	18
5.1. Objetivo general.....	18
5.2. Objetivos específicos .....	18
6. MATERIALES Y MÉTODOS .....	19
6.1. Muestreo de plantas de arándano con cáncer de tallo.....	19
6.2. Aislamiento de <i>Pestalotiopsis</i> spp. ....	20
6.3. Caracterización morfológica de <i>Pestalotiopsis</i> spp. ....	22
6.3.1. Caracterización morfológica macroscópica .....	22
6.3.2. Caracterización morfológica microscópica .....	23

6.4. Pruebas de patogenicidad.....	24
6.5. Caracterización molecular de <i>Pestalotiopsis</i> spp.....	25
6.5.1. Extracción de ADN genómico .....	26
6.5.2. Electroforesis de ADN genómico.....	26
6.5.3. Inter Secuencias Simples Repetidas (ISSR).....	26
6.5.4. Análisis de datos moleculares .....	28
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	29
7.1. Muestreo de plantas de arándano con cáncer de tallo y aislamiento de <i>Pestalotiopsis</i> spp. ....	29
7.2. Caracterización morfológica macroscópica de aislados de <i>Pestalotiopsis</i> spp....	30
7.3. Caracterización morfológica microscópica de aislados de <i>Pestalotiopsis</i> spp. ...	32
7.4. Análisis de componentes principales .....	35
7.5. Pruebas de patogenicidad.....	41
7.6. Caracterización molecular.....	46
8. CONCLUSIONES .....	53
9. LITERATURA CITADA .....	54

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Planta de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) (A). Fruto de arándano variedad Biloxi de calibre mediano (B) (Fall Creek<sup>®</sup> Farm & Nursery INC, 2017)..... 3
- Figura 2. Principales países productores de arándano (*V. corymbosum* L.) a nivel mundial en el año 2014, la producción se reporta en miles de toneladas (FAOSTAT, 2017)..... 5
- Figura 3. Planta con cáncer de tallo ocasionado por *Botryosphaeria corticis* (A). Tallo con manchas rojizas y lesiones cónicas (B). Tallo con lesiones necróticas profundas (C) (Michigan State University, 2017). ..... 7
- Figura 4. Cáncer de tallo ocasionado por *Neofusicoccum* spp. Planta con algunos tallos deshidratados con coloración rojiza (A). Tallo con una mancha rojiza y borde necrótico (B). Tallo con lesión marrón y presencia de cuerpos fructíferos del hongo (C). Tallo con picnidios en la superficie y desprendimiento de cutícula (D) (Michigan State University, 2017)..... 8
- Figura 5. Cáncer de tallo asociado a *Phomopsis vaccinii*. Planta con algunos tallos deshidratados de color rojizo (A). Tallo con lesiones necróticas (B). Tallo con lesión necrótica en fase inicial (C). Tallo totalmente deshidratado con manchas marrones y negras (D). Cuerpos fructíferos del hongo con expulsión de conidios (E) (Michigan State University, 2017). ..... 9
- Figura 6. Cáncer de tallo asociado a *Pestalotiopsis* spp. Planta de arándano con muerte de ramillas terminales (A). Tallo con presencia de necrosis (B). Corte transversal del tallo con cáncer (C). Presencia de acérvulos en tallo (D).... 11
- Figura 7. Conidios típicos de *Pestalotiopsis* spp. Conidio versicoloro de *Pestalotiopsis* spp. (A). Conidio concoloro de *Pestalotiopsis* spp. (B). Tomado de Maharachchikumbura *et al.*, (2011)..... 13

Figura 8. Conidio de <i>Pestalotiopsis neglecta</i> . LAR: largo del conidio. ANC: ancho del conidio. NOA: número de ornamentaciones apicales. NOB: número de ornamentaciones basales. Modificado de Steyaert, (1953).....	13
Figura 9. Esquema representativo de la amplificación de un segmento entre dos secuencias microsatélite con un oligonucleótido (AG) <sub>8</sub> (A), anclado al extremo 3' (B) y anclado al extremo 5' (C). Modificado de Reddy <i>et al.</i> , (2002).....	15
Figura 10. Estados y municipios del occidente de México en los que se llevó a cabo el muestreo de plantas de arándano con cáncer de tallo. Jalisco (A). Michoacán (B). Colima (C).....	20
Figura 11. Esquema representativo del aislamiento del patógeno de plantas con cáncer de tallo procedentes de Jalisco, Colima y Michoacán. Corte transversal de un tallo de arándano con cáncer (A). Fragmentos de tejido vegetal de la zona de avance de la lesión (B). Desinfección de los fragmentos de tejido vegetal (C). Secado de los fragmentos de tejido vegetal (D). Crecimiento micelial de <i>Pestalotiopsis</i> spp. en medio PDA después de 2 d a 25 °C (E). Colonia característica de <i>Pestalotiopsis</i> spp. después de 7 d de crecimiento a 25 °C en medio PDA (F).....	21
Figura 12. Colonia típica de <i>Pestalotiopsis</i> sp. Anverso de la colonia (A). Presencia de acérvulos abundantes en la colonia fúngica (B). .....	22
Figura 13. Esquema representativo de las pruebas de patogenicidad realizadas con 13 aislados de <i>Pestalotiopsis</i> spp. procedentes de Jalisco, Colima y Michoacán. Discos de micelio de <i>Pestalotiopsis</i> spp con un diámetro de 4 mm (A). Inoculación de tallos de arándano con discos de micelio de <i>Pestalotiopsis</i> spp. y <i>Fusarium</i> sp. (B). Tallos de arándano con una lesión necrótica después de 5 d de la inoculación (C). Tallo con cáncer asociado a <i>Pestalotiopsis</i> spp. proveniente de campo (D). .....	25
Figura 14. Caracterización macroscópica de algunos aislados de <i>Pestalotiopsis</i> spp. provenientes de Jalisco, Michoacán y Colima.....	30

- Figura 15. Caracterización microscópica de 26 aislados de *Pestalotiopsis* spp. provenientes de Jalisco (J1 a J6), Colima (C1) y Michoacán (M1)..... 33
- Figura 16. Variables registradas en la caracterización morfológica microscópica de 26 aislados de *Pestalotiopsis* spp. provenientes de Jalisco, Colima y Michoacán. La línea sobre la barra indica la desviación estándar..... 34
- Figura 17. Variables de mayor valor descriptivo en función de los dos primeros componentes principales, obtenidos con la matriz de correlación de nueve variables. LAR: largo del conidio. ANC: ancho del conidio. NOA: número de ornamentaciones apicales. OA1 a OA4: longitud de las ornamentaciones apicales 1 a la 4. NOB: número de ornamentaciones basales. OB1: longitud de la ornamentación basal 1..... 38
- Figura 18. Distribución de la diversidad morfológica de 26 aislados de *Pestalotiopsis* spp. provenientes de Jalisco (J1 a J6), Colima (C1) y Michoacán (M1) en función de los dos primeros componentes principales, obtenidos con la matriz de correlación de las nueve variables. .... 39
- Figura 19. Pruebas de patogenicidad realizadas en tallos de arándano variedad Biloxi con 13 aislados de *Pestalotiopsis* spp. provenientes de Jalisco (J1 a J6), Colima (C1) y Michoacán (M1). Además de un testigo negativo: *Fusarium* sp. y un testigo absoluto. Las lesiones mostradas fueron después de 5 d de la inoculación con el hongo. .... 42
- Figura 20. Análisis estadístico de las pruebas de patogenicidad a los 5 d después de la inoculación, realizadas en tallos de arándano variedad Biloxi con 13 aislados de *Pestalotiopsis* spp. provenientes de Jalisco (J1 a J6), Michoacán (M1) y Colima (C1). Además de un testigo negativo: *Fusarium* sp. y un testigo absoluto. La línea sobre la barra indica la desviación estándar. .... 44
- Figura 21. Patrón de amplificación en geles de agarosa al 1.1% con los oligonucleótidos ISSR OL1 a OL4. M: marcador de tamaño molecular. Carriles 1 al 25: aislados de *Pestalotiopsis* spp. provenientes de Jalisco. Carriles 26 al 32: aislados de *Pestalotiopsis* spp. procedentes de Michoacán. Carriles 33 y 34:

aislados de *Pestalotiopsis* spp. provenientes de Colima. Carril 35:  
*Macrophomina phaseolina*, control negativo. .... 48

Figura 22. Patrón de amplificación en geles de agarosa al 1.1% con los oligonucleótidos  
ISSR OL5 a OL8. M: marcador de tamaño molecular. Carriles 1 al 25:  
aislados de *Pestalotiopsis* spp. provenientes de Jalisco. Carriles 26 al 32:  
aislados de *Pestalotiopsis* spp. procedentes de Michoacán. Carriles 33 y 34:  
aislados de *Pestalotiopsis* spp. provenientes de Colima. Carril 35:  
*Macrophomina phaseolina*, control negativo. .... 49

Figura 23. Dendrograma obtenido por el método de agrupamiento UPGMA para los 34  
aislados de *Pestalotiopsis* spp. provenientes de Jalisco (J1 a J6), Colima  
(C1) y Michoacán (M1), como método de distancia se empleó el coeficiente  
de similitud de Jaccard (Mattioni *et al.*, 2002). Mph: *Macrophomina*  
*phaseolina*, control negativo..... 51

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Variables registradas en la caracterización morfológica microscópica de conidios de <i>Pestalotiopsis</i> spp. ....	23
Cuadro 2. Oligonucleótidos utilizados en la caracterización molecular de <i>Pestalotiopsis</i> spp. mediante ISSR.....	28
Cuadro 3. Estados y municipios de la zona occidente de México, en los que se realizó el muestreo de plantas de arándano variedad Biloxi con cáncer de tallo. ....	29
Cuadro 4. Caracterización morfológica macroscópica de 26 aislados de <i>Pestalotiopsis</i> spp. procedentes de Jalisco (J1 a J6), Colima (C1) y Michoacán (M1). ....	31
Cuadro 5. Resultado del análisis de componentes principales: valores propios, varianza absoluta y varianza acumulada obtenidos con base en la matriz de correlaciones de 9 variables cuantitativas de 26 aislados de <i>Pestalotiopsis</i> spp. provenientes de Jalisco, Colima y Michoacán. ....	36
Cuadro 6. Vectores característicos de las variables de mayor valor descriptivo, respecto a su componente principal de 26 aislados de <i>Pestalotiopsis</i> spp. provenientes de Jalisco, Colima y Michoacán.....	37
Cuadro 7. Pruebas de patogenicidad realizadas en tallos de arándano variedad Biloxi con 13 aislados de <i>Pestalotiopsis</i> spp. provenientes de Jalisco, Colima y Michoacán.....	41
Cuadro 8. Características de los fragmentos ISSR amplificados a partir de 34 aislados de <i>Pestalotiopsis</i> spp. procedentes de Jalisco, Colima y Michoacán: rango de amplificación, número de bandas producidas, número de bandas polimórficas y porcentaje de bandas polimórficas. ....	47



## ABREVIATURAS

A	Adenina
ACP	Análisis de componentes principales
ADN	Ácido desoxirribonucleico
C	Citosina
°C	Grado (s) Celsius
cm	Centímetro (s)
cm <sup>2</sup>	Centímetro (s) cuadrado (s)
d	Día (s)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
g	Gramo
G	Guanina
h	Hora (s)
ha	Hectárea (s)
ISSR	Inter secuencias simples repetidas, por sus siglas en inglés
Kb	Kilobase
kg	Kilogramo (s)
KOH	Hidróxido de potasio
L	Litro (s)
L.	Linneo
m	Metro (s)
M	Molar
mg	Miligramo (s)
min	Minuto (s)
mL	Mililitro (s)
mm	Milímetro (s)
mM	Milimolar
msnm	Metros sobre el nivel del mar
NaClO	Hipoclorito de sodio
ng	Nanogramo (s)
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés

PDA	Agar dextrosa papa, por sus siglas en inglés
pM	Picomolar
p/v	Relación peso a volumen
s	Segundo (s)
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
SENASICA	Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria
SIAP	Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera
sp.	Especie
spp.	Diferentes especies
SSR	Secuencias simples repetidas, por sus siglas en inglés
t	Tonelada (s)
T	Timina
TAE	Regulador tris ácido acético EDTA
UPGMA	Promedio aritmético de los grupos de pares no ponderados, por sus siglas en inglés
V	Volt (s)
µg	Microgramo (s)
µL	Microlitro (s)
µM	Micromolar

## 1. INTRODUCCIÓN

El arándano es apreciado por su alto contenido de antioxidantes, principalmente antocianinas, cuya concentración es de 25 a 495 mg/100 g de fruto fresco (Wang *et al.*, 2010), la cual es una de las más elevadas de todas las frutas y verduras, además es una excelente fuente de vitamina C (Ratnaparkhe, 2007). Los frutos se consumen frescos, cocidos, deshidratados, congelados o como infusión, también se utiliza para hacer mermeladas, puré, jugos, licores, ingredientes para pastelería y cereales entre otros (Lim, 2012; SAGARPA, 2017). Estados Unidos de América es el mayor productor y consumidor de arándano a nivel mundial, con una superficie de 34 297 ha cosechadas en el 2014 (FAOSTAT, 2017).

El arándano pertenece a la familia de las *Ericaceae*, género *Vaccinium*, subgénero *Cyanococcus*, cuenta con alrededor de 400 especies, entre las que destacan por su importancia económica *V. corymbosum*. La mayoría se desarrollan en los trópicos a gran altitud, pero también en climas templados y boreales, crecen en suelos arenosos y ácidos (Ratnaparkhe, 2007). Es originario del este de Norteamérica, de Ontario a Nueva Escocia, al sur de Alabama y oeste de Wisconsin (Lim, 2012).

En México el cultivo de arándano ha aumentado un 800% del año 2010 al 2016, gracias al aprovechamiento de la ventana de oportunidad de importación del fruto hacia Estados Unidos de América. Lo anterior debido a que el consumo per cápita presenta un incremento anual del 10% y se ubica en 1.4 kg de fruto/persona/año (Ford, 2017). En nuestro país se cultivan alrededor de 3207 ha en 9 estados del país. Sin embargo en la zona occidente se concentra el 73% de la producción total, cuyo valor se estima en 1653 millones de pesos (SIAP, 2017).

A pesar de que el cultivo es relativamente joven se han presentado serios problemas de plagas y enfermedades, una de las cuales es el cáncer de tallo. Dicha enfermedad reportó una incidencia del 38% en el año 2012 (Mondragón *et al.*, 2012), la cual es asociada a un conjunto de hongos fitopatógenos, tales como *Botryosphaeria corticis* (Milholland y Galletta, 1969; Milholland, 1970; Sammonds *et al.*, 2009), *Phomopsis*

*vaccinii* (Weingartner y Klos, 1974; Daykin y Milholland, 1990; Farr *et al.*, 2002), *Neofusicoccum* spp. (Weingartner y Klos, 1974; Espinoza *et al.*, 2009; Boyzo *et al.*, 2016) y *Pestalotiopsis* spp. (Espinoza *et al.*, 2008; González *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2016). Cabe señalar que son escasos los estudios que determinen al agente causal de dicha enfermedad en las plantaciones de nuestro país.

Los síntomas del cáncer de tallo se observan comúnmente en los brotes jóvenes de primavera, caracterizados por la marchitez del extremo apical el cual se curva en forma de bastón. Además se observan lesiones superficiales en las que se pueden observar puntos negros inmersos en la corteza, los cuales corresponden a los cuerpos fructíferos del hongo (Pritts y Hancock, 1992; Espinoza *et al.*, 2008; Cisternas y France, 2009). Esta enfermedad puede causar la muerte de las plantas a cualquier edad o disminuir su rendimiento de manera importante.

Actualmente, el tratamiento indicado es la aplicación de fungicidas que han demostrado baja efectividad (Virgen, 2017). Por tal motivo se requiere buscar alternativas de prevención y control de la enfermedad en cada zona del cultivo, ya que las condiciones agroclimáticas del occidente de México son diversas y esto podría influir en la baja efectividad de los fungicidas aplicados. Por lo descrito anteriormente, el objetivo del presente trabajo se centra en determinar la asociación de *Pestalotiopsis* spp. con el cáncer de tallo de arándano y caracterizar a nivel morfológico y molecular aislados de dicho hongo procedentes de la zona occidente de México: Jalisco, Colima y Michoacán.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Arándano (*Vaccinium corymbosum* L.)

El arándano pertenece a la familia de las *Ericaceae*, género *Vaccinium*, subgénero *Cyanococcus*, que cuenta con alrededor de 400 especies, entre las que destacan por su importancia económica *V. corymbosum*, *V. angustifolium*, *V. ashei* (Ratnaparkhe, 2007).

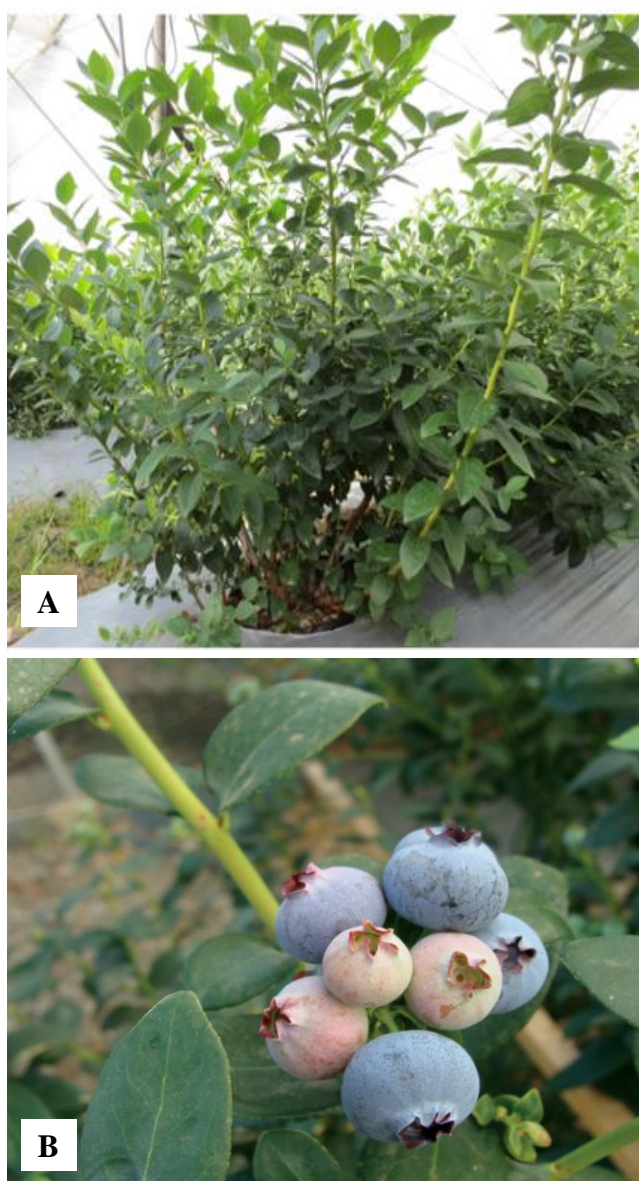


Figura 1. Planta de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) (A). Fruto de arándano variedad Biloxi de calibre mediano (B) (Fall Creek<sup>®</sup> Farm & Nursery INC, 2017).

El arándano es un arbusto caducifolio que llega a medir de 1 a 3.5 m de altura y puede vivir hasta 20 años (SAGARPA, 2017). Es una planta erecta que presenta varios tallos secundarios con hojas elípticas lanceoladas de unos 5 cm de longitud. Produce bayas de 1 a 3 cm de diámetro con un peso de 0.5 a 4.0 g (Lim, 2012) (Figura 1).

### **2.1.1. Situación actual del cultivo de arándano en México**

Las primeras plantas de arándano (*Vaccinium* sp.) llegaron a México en la década de los 70's a Zacatlán, Puebla provenientes de Arkansas, Estados Unidos. En el año de 1995 se reportan plantaciones comerciales en 175 ha de la misma zona (Gómez, 2010), sin embargo el cultivo cobra relevancia en el 2003 con 325 ha establecidas (Retamales y Hancock, 2012). Para el año 2014, México se posicionó como un productor importante de arándano (*V. corymbosum* L.) a nivel mundial, ya que se ubicó como el tercer país productor con 18 031 t de fruto. Estados Unidos de América y Canadá en el mismo año se ubicaron en el primer y segundo lugar con 262 539 y 182 275 t de fruto, respectivamente (FAOSTAT, 2017) (Figura 2).

En nuestro país el cultivo de arándano sigue en aumento, actualmente se cultivan alrededor de 3207 ha y se cosechan 29 000 t de fruto en 9 estados del país distribuidos de la siguiente manera: Jalisco 46.8%, Michoacán 19.1%, Sinaloa 10.9%, Colima 7.5%, Puebla 7.2%, Baja California 6.9%, Sonora 1.1%, México 0.5% y Guanajuato 0.1%. El valor de la producción es de aproximadamente 1653 millones de pesos (SIAP, 2017).

La variedad más cultivada en México es Biloxi, la cual es una variedad libre de patente, crece en regiones templadas entre 270 y 2900 msnm. Esta variedad produce un fruto de tamaño mediano, de color azul claro, muy firme y de excelente sabor (buen balance entre dulzura y acidez) (Fall Creek<sup>®</sup> Farm & Nursery INC, 2017).

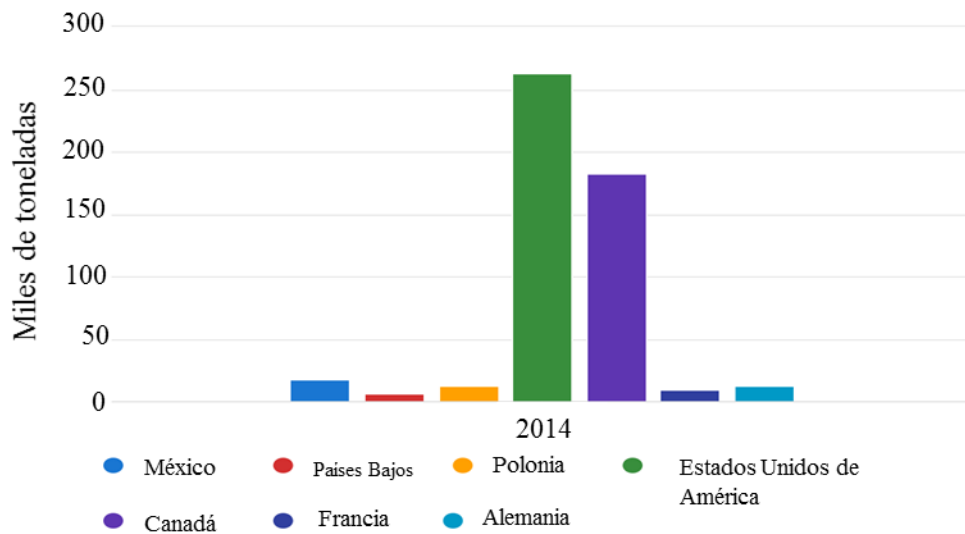


Figura 2. Principales países productores de arándano (*V. corymbosum* L.) a nivel mundial en el año 2014, la producción se reporta en miles de toneladas (FAOSTAT, 2017).

## 2.2. Enfermedades que afectan el arándano

El arándano es una especie vigorosa, de rápido crecimiento y altos rendimientos, pero susceptible a varias enfermedades que pueden alterar su desarrollo, acortar su vida productiva y afectar la calidad y cantidad de fruto. La alta densidad de plantas que poseen los predios y los altos niveles de nutrientes que se utilizan para mantener máximos niveles productivos, facilitan el establecimiento y diseminación de enfermedades (Pritts y Hancock, 1992).

Las enfermedades que afectan al arándano varían, de acuerdo a la especie, variedad, región de cultivo, y puede ser atacado por virus, bacterias y hongos. Las enfermedades de mayor impacto económico son asociadas a hongos, tales como antracnosis, mancha foliar, tizón del tallo y cáncer de tallo. Esta última enfermedad se ha reportado desde hace casi 50 años con pérdidas económicas importantes (Milholland y Galletta, 1969) y en la actualidad su etiología aún es imprecisa.

### 2.2.1. Cáncer de tallo

El cáncer de tallo fue una de las primeras enfermedades observadas en las plantaciones americanas, adquiriendo importancia económica, ya que puede llegar a matar por completo a plantas jóvenes o disminuir su rendimiento productivo. Los síntomas del cáncer de tallo inician con la clorosis de las hojas y leve enrojecimiento del borde de la lámina foliar, seguido de una rápida marchitez del follaje, similar a la falta de agua. Posteriormente las hojas se tornan café claro y permanecen adheridas por un tiempo. La muerte de tallos es repentina y se produce normalmente desde mediados del verano. En la base de las ramas infectadas se pueden presentar daños en la corteza y desarrollo de lesiones convexas irregulares. Sobre la corteza o debajo de esta, se observan picnidios de color negro que normalmente están agrupados. Al cortar las ramas enfermas, se observa un tejido necrótico parcial con forma de abanico o semicírculo, la que crece hasta necrosar toda la rama, momento en el cual se produce la muerte. Las esporas producidas se diseminan con la lluvia. Los frutos dañados son blandos, a menudo se agrietan y pierden jugo (Pritts y Hancock, 1992; Cisternas y France, 2009).

La mejor forma de cortar el ciclo de la enfermedad es la poda sanitaria a medida que se van produciendo las ramas muertas, sin embargo no es fácil eliminar la rama completa y es común observar pequeños tallos después de la poda que permiten la reproducción del hongo. La poda debe ser al nivel del suelo y la porción a eliminar son los primeros 10 cm a partir de la corona de la planta. Como complemento están las aplicaciones de fungicidas en otoño y al comenzar la primavera (Aneberries, 2017).

En México en el año 2012, el cáncer de tallo reportó una incidencia del 38% (Mondragón *et al.*, 2012), sin embargo existen pocos estudios que aborden la problemática y realicen pruebas para determinar al (los) agente (s) etiológico (s) de esta enfermedad. En campo es difícil diferenciar los síntomas producidos por los distintos hongos asociados al cáncer de tallo, a continuación se describirán los síntomas producidos por los cuatro géneros fúngicos comúnmente asociados a dicha enfermedad: *Botryosphaeria corticis*, *Neofusicoccum* spp., *Phomopsis vaccinii* y *Pestalotiopsis* spp. (Sammonds *et al.*, 2009; Farr *et al.*, 2002; Boyzo *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2016).



### 2.2.1.1. *Botryosphaeria corticis*

El cáncer de tallo asociado a *Botryosphaeria corticis* es una enfermedad caracterizada por la presencia de manchas rojas en los tallos, las lesiones se hinchan y se vuelven cónicas en un lapso aproximado de 6 meses. En variedades altamente susceptibles se forman lesiones profundas en el tejido y presentan numerosos cuerpos fructíferos del hongo (Figura 3). En un periodo de 2 a 3 años los tallos infectados pueden morir (Milholland, 1970; Sammonds *et al.*, 2009).

El ciclo de la enfermedad se lleva a cabo con la presencia de tallos infectados en donde el hongo pasa el invierno. En la época de primavera el hongo encuentra las condiciones óptimas para esporular (25-28 °C) y las esporas se vuelven evidentes en el tejido infectado (Pritts y Hancock, 1992).

Las recomendaciones para prevenir la diseminación del hongo, es utilizar variedades resistentes y plantas libres de patógenos. Si se llegan a presentar plantas enfermas se deben destruir, ya que generalmente la eficacia biológica de los fungicidas es baja (Michigan State University, 2017).



Figura 3. Planta con cáncer de tallo ocasionado por *Botryosphaeria corticis* (A). Tallo con manchas rojizas y lesiones cónicas (B). Tallo con lesiones necróticas profundas (C) (Michigan State University, 2017).

### 2.2.1.2. *Neofusicoccum* spp.

Este tipo de cáncer de tallo se favorece bajo condiciones de alta humedad (otoño), por lo cual en primavera y verano los tallos presentan manchas marrón rojizo con un margen oscuro. Las lesiones generalmente aparecen en la cicatriz de la hoja, tiene de 1 a 10 cm de longitud y se presentan cerca del nivel del suelo, pero algunos pueden presentarse hasta 1 m sobre el suelo. Las lesiones convexas crecen cada año y pueden llegar a matar al tallo. Las hojas marchitas permanecen plegadas hacia el tallo. En algunas lesiones se pueden llegar a presentar puntos negros, los cuales son los cuerpos fructíferos del hongo (Espinoza *et al.*, 2009; Boyzo *et al.*, 2016) (Figura 4).

Este hongo es capaz de penetrar el tejido en 48 h (no se relaciona con las podas) en una temperatura de 10 a 22 °C. Se recomienda eliminar tallos infectados y destruir plantas muertas para evitar la diseminación de conidios (Michigan State University, 2017).

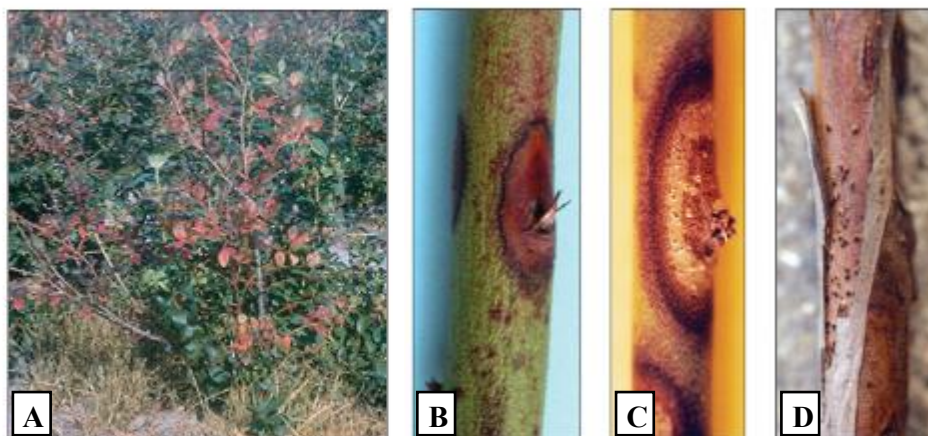


Figura 4. Cáncer de tallo ocasionado por *Neofusicoccum* spp. Planta con algunos tallos deshidratados con coloración rojiza (A). Tallo con una mancha rojiza y borde necrótico (B). Tallo con lesión marrón y presencia de cuerpos fructíferos del hongo (C). Tallo con picnidios en la superficie y desprendimiento de cutícula (D) (Michigan State University, 2017).

### 2.2.1.3. *Phomopsis vaccinii*

En el arándano podemos apreciar los síntomas como muerte regresiva de ramillas terminales hasta llegar a la base de la ramilla. También, desarrollo de lesiones superficiales y lisas, sobre los cuales se pueden formar picnidios que están inmersos en la corteza, se observan como pequeños puntos negros en la superficie de la rama infectada (Figura 5). La muerte de ramas afecta la parte productiva de la próxima temporada (Weingartner, 1969; Farr *et al.*, 2002; Latorre *et al.*, 2013).

La enfermedad puede estar presente en los viveros cuando se induce la formación de raíces en tallos provenientes de plantas enfermas. Dichos tallos producen numerosos picnidios, que durante la primavera liberan conidios que se diseminan con la lluvia y el viento. Se recomienda cortar los tallos infectados y aplicar fungicidas como fenbuconazol (Daykin y Milholland, 1990; Aneberries, 2016).

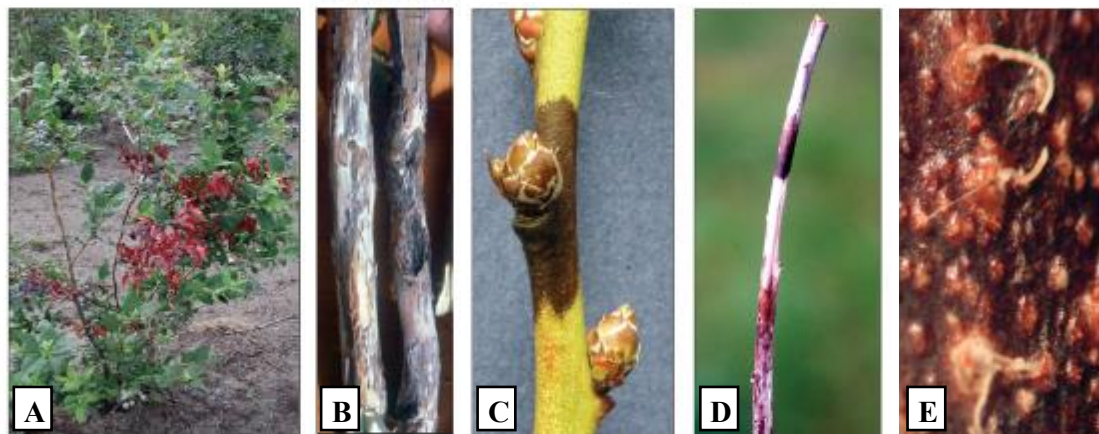


Figura 5. Cáncer de tallo asociado a *Phomopsis vaccinii*. Planta con algunos tallos deshidratados de color rojizo (A). Tallo con lesiones necróticas (B). Tallo con lesión necrótica en fase inicial (C). Tallo totalmente deshidratado con manchas marrones y negras (D). Cuerpos fructíferos del hongo con expulsión de conidios (E) (Michigan State University, 2017).

#### **2.2.1.4. *Pestalotiopsis* spp.**

Los síntomas que produce *Pestalotiopsis* spp. al infectar la planta de arándano son más evidentes en tallos jóvenes, los cuales muestran necrosis. En plantas infectadas es frecuente apreciar clorosis del follaje y muerte completa de ramas. En los tallos se producen numerosos acérvulos (estructuras reproductivas con forma de “cojín”), que levantan la corteza para liberar gran cantidad de conidios de color negro (Espinoza *et al.*, 2008) (Figura 6).

Esta enfermedad es importante en viveros donde las condiciones de alta humedad y temperatura, más la presencia de abundantes tejidos jóvenes, facilita su desarrollo. El inóculo puede provenir de tejidos enfermos de arándanos, así como de otros huéspedes. Los conidios son diseminados por la lluvia y el viento (Cisternas y France, 2009).

Esta enfermedad debe manejarse eliminando los residuos de plantas, de lo contrario el reservorio de inóculo es constante. La poda sanitaria permite eliminar este tipo de ramillas, pero siempre que no queden en el mismo predio. Fungicidas aplicados al tallo ayudan a disminuir la esporulación del hongo (García y García, 2010; Aneberries, 2016).

El cáncer de tallo de arándano asociado a *Pestalotiopsis* spp. probablemente es el de mayor incidencia en México, debido a que en nuestro país la mayoría de las plantaciones son jóvenes: de 1 a 4 años de edad. Además de lo anterior, las podas que se realizan año con año favorecen el desarrollo de esta enfermedad, principalmente de dos formas: la primera es debida a las lesiones que sufre la planta, ya que el hongo penetra fácilmente e infecta a la planta y la segunda se relaciona con el desarrollo permanente de tallos de menos de 1 año de edad presentes en todas las plantaciones (Virgen, 2017).



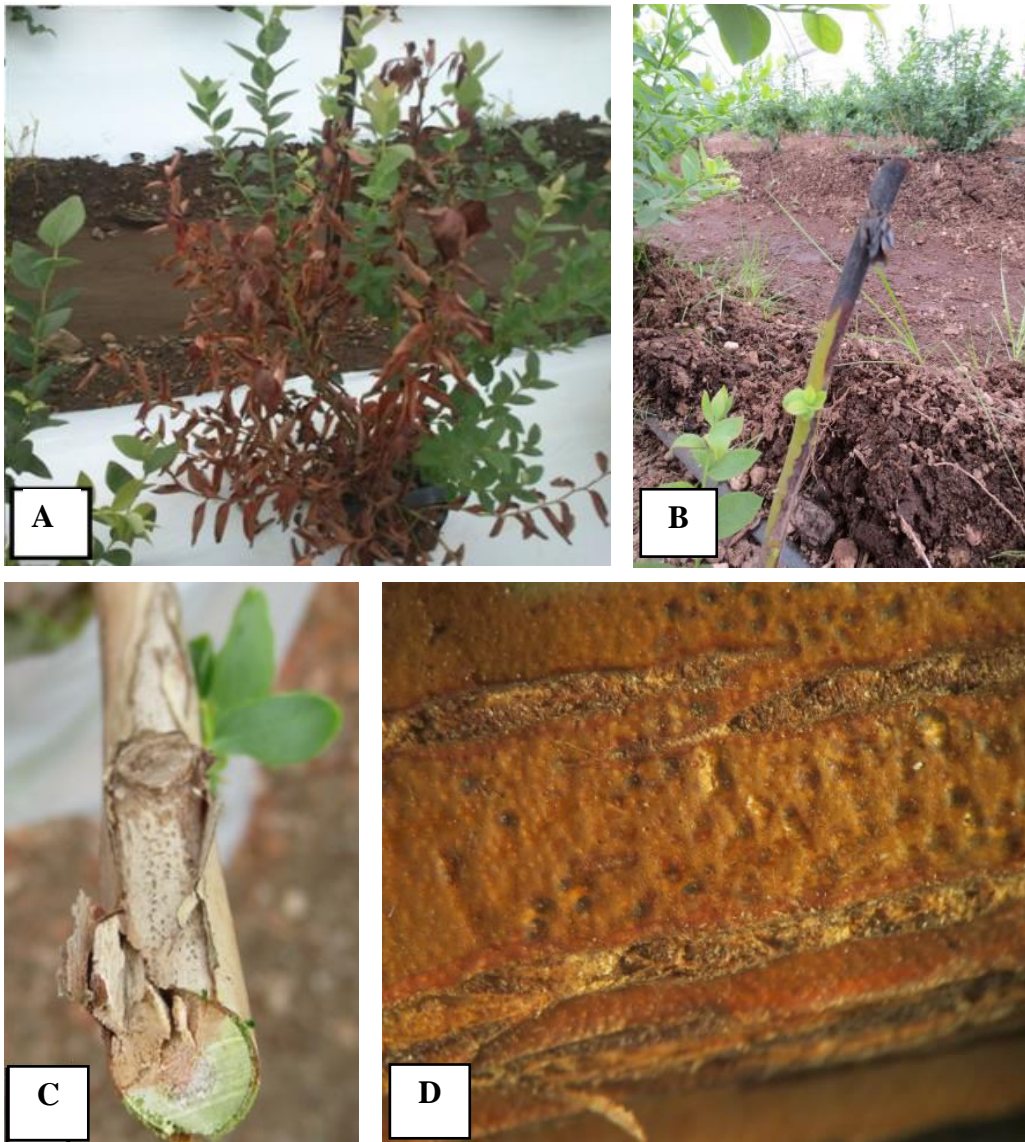


Figura 6. Cáncer de tallo asociado a *Pestalotiopsis* spp. Planta de arándano con muerte de ramillas terminales (A). Tallo con presencia de necrosis (B). Corte transversal del tallo con cáncer (C). Presencia de acérvulos en tallo (D).

#### 2.2.1.4.1. Taxonomía de *Pestalotiopsis*

En 1949 Steyaert, dividió al género *Pestalotia* en tres géneros, *Pestalotia* representado por especies con conidios de 6 células, *Truncatella* caracterizado por especies con conidios de 4 células y *Pestalotiopsis*, especies con conidios de 5 células; esta clasificación es la más usada en la actualidad (Maharachchikumbura *et al.*, 2014a; 2014b).

*Pestalotiopsis* pertenece a la familia *Amphisphaeriaceae*, se caracteriza por presentar conidios con tres células medias pigmentadas, mientras las células de los extremos son hialinas. El conidio posee ornamentaciones apicales y basales. Todas estas características se utilizan para diferenciar las especies, pero el patrón de pigmentación de las células medias es el que posee mayor peso taxonómico (Maharachchikumbura *et al.*, 2014b; Jeewon *et al.*, 2003).

Se han realizado diversos estudios para caracterizar morfológicamente aislados de *Pestalotiopsis*. Las variables macroscópicas que se toman en cuenta principalmente, son el color de la colonia, tipo de micelio, presencia de acérvulos y tasa de crecimiento radial. Para la caracterización microscópica se determinan: el número de células, la coloración de las células medias del conidio, concoloro (las tres células del mismo color) o versicoloro (las tres células con diferente coloración) (Figura 7), el largo, ancho, número y longitud de ornamentaciones apicales y basales (Figura 8) (Jeewon *et al.*, 2002 y 2003; Maharachchikumbura *et al.*, 2011).

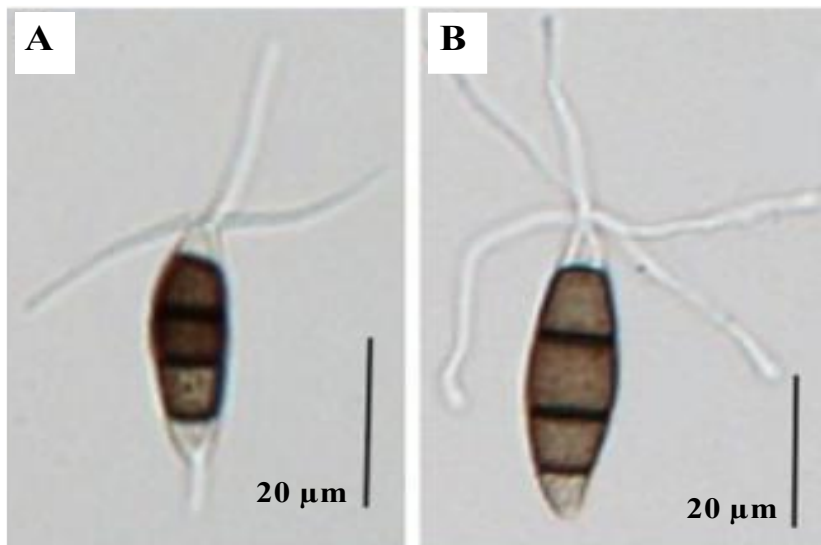


Figura 7. Conidios típicos de *Pestalotiopsis* spp. Conidio versicoloro de *Pestalotiopsis* spp. (A). Conidio concoloro de *Pestalotiopsis* spp. (B). Tomado de Maharachchikumbura *et al.*, (2011).

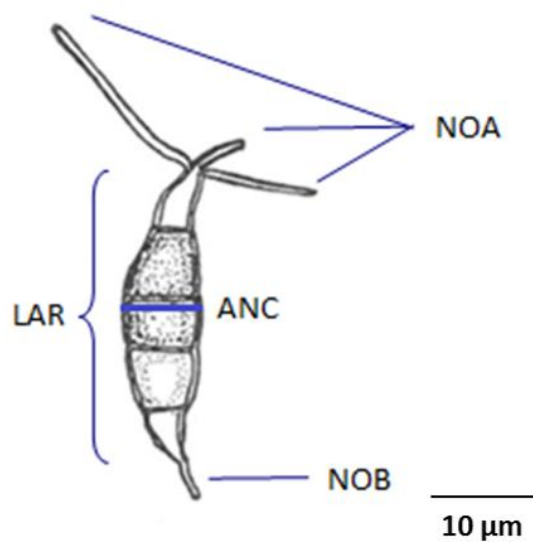


Figura 8. Conidio de *Pestalotiopsis neglecta*. LAR: largo del conidio. ANC: ancho del conidio. NOA: número de ornamentaciones apicales. NOB: número de ornamentaciones basales. Modificado de Steyaert, (1953).

### 2.3. Marcadores moleculares: ISSR

Las Inter Secuencias Simples Repetidas o ISSR (Inter Simple Sequence Repeat), por sus siglas en inglés, es una técnica que implica el uso de microsatélites (Secuencias Simples Repetidas, SSR) como oligonucleótidos en una PCR, para detectar polimorfismo entre dichos microsatélites (secuencias ubicuas en genomas eucarióticos) (Godwin *et al.*, 1997; Reddy *et al.*, 2002).

Los marcadores ISSR son dominantes, altamente polimórficos y útiles en estudios sobre variabilidad genética, filogenia, marcaje genético y biología evolutiva. En esta técnica se utilizan oligonucleótidos de 16 a 25 pb que consisten en un motivo repetido di, tri, tetra o penta nucleótidos. Es frecuente agregar de una a cuatro bases arbitrarias que servirán de ancla al extremo 5' ó 3' (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Reddy *et al.*, 2002) (Figura 9).

Las ventajas del empleo de esta técnica, además del alto nivel de polimorfismo, son su reproducibilidad, ya que los oligonucleótidos son más largos que en otras técnicas (RAPD y AFLP); no se requieren altas concentraciones de ADN, tampoco es necesario conocer el genoma del organismo problema, son económicos y relativamente sencillos de estandarizar (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Godwin *et al.*, 1997; Reddy *et al.*, 2002).



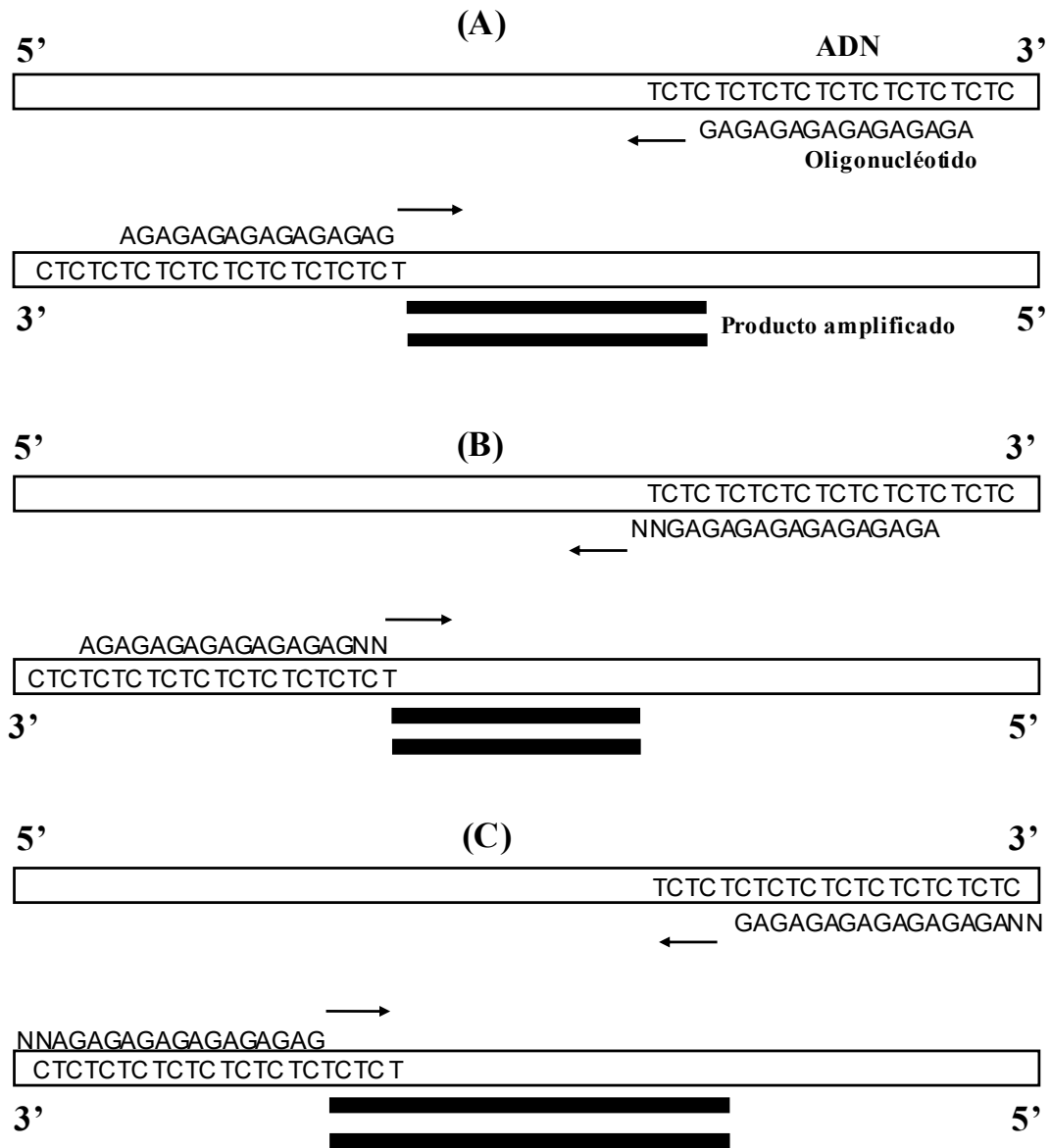


Figura 9. Esquema representativo de la amplificación de un segmento entre dos secuencias microsatélite con un oligonucleótido (AG)<sub>8</sub> (A), anclado al extremo 3' (B) y anclado al extremo 5' (C). Modificado de Reddy *et al.*, (2002).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente se han realizado diversos estudios que relacionan la actividad de los antioxidantes (sustancias que reducen el daño oxidativo causado por radicales libres) con un efecto anticancerígeno, antiinflamatorio y antitumoral. Dichos efectos son objeto de estudio en investigaciones médicas que asocian el consumo de antioxidantes con la prevención y reducción de enfermedades como el cáncer, la diabetes, la hipertensión arterial, la obesidad, etc. Por tal motivo, los expertos en salud han recomendado a la población consumir alimentos ricos en antioxidantes, tales como los frutos rojos: fresas, frambuesas, zarzamoras y arándanos, principalmente. Entre estos frutos, destaca el arándano por su alto contenido de antocianinas de 25 a 495 mg/100 g de fruto fresco. Debido a lo anterior, el consumo de arándano por persona crece un 10% anual y con ello la demanda a nivel mundial. En nuestro país el cultivo de arándano tiene una gran importancia por la cercanía con Estados Unidos de América, el mayor consumidor de arándano a nivel mundial, además el costo de producción es muy rentable, ya que existen variedades que se adaptan con facilidad al clima templado de algunas regiones de México. El crecimiento del cultivo es más relevante en la zona occidente, que incluye los estados de Jalisco, Colima y Michoacán. En dicha región la producción del fruto se duplicó en tan solo un año, en el 2015 se cosecharon 11 000 t, mientras que en 2016 la producción fue de 22 000 t de arándano. Debido al incremento acelerado de la superficie cultivada, se han desarrollado diversos problemas fitosanitarios, uno de los cuales es el cáncer de tallo asociado a diferentes géneros fúngicos. Sin embargo, actualmente se cuenta con escasa información acerca del agente causal de dicha enfermedad y si presenta variabilidad genética en las diferentes regiones, lo cual dificulta su prevención y control. Por lo cual es importante llevar a cabo trabajos de investigación que determinen el agente etiológico del cáncer de tallo en plantaciones en México, así como analizar la variabilidad morfológica y genética de dicho agente para establecer estrategias adecuadas de prevención, diagnóstico y control de la enfermedad.

#### 4. HIPÓTESIS

*Pestalotiopsis* spp. está asociado al cáncer de tallo en plantas de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) y presenta variabilidad morfológica y molecular entre los aislados provenientes de diferentes regiones del occidente de México.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo general

Caracterizar a nivel morfológico y molecular a *Pestalotiopsis* spp. y determinar su asociación con el cáncer de tallo de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) en el occidente de México.

### 5.2. Objetivos específicos

1. Determinar la presencia de *Pestalotiopsis* spp. como uno de los agentes causales del cáncer de tallo en arándano
2. Caracterizar a nivel morfológico a *Pestalotiopsis* spp. aislado de plantas de arándano con cáncer de tallo provenientes de Jalisco, Colima y Michoacán
3. Caracterizar mediante Inter Secuencias Simples Repetidas a *Pestalotiopsis* spp. aislado de plantas de arándano con cáncer de tallo procedentes de Jalisco, Colima y Michoacán

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1. Muestreo de plantas de arándano con cáncer de tallo**

El muestreo se llevó a cabo en tres importantes estados productores de arándano del occidente del país, Jalisco, Colima y Michoacán; los cuales concentran el 73% de la producción nacional (SIAP, 2017). Las plantas colectadas fueron de la variedad Biloxi de uno a tres años de edad, con síntomas característicos de cáncer de tallo. Las muestras se colectaron de ocho municipios de Jalisco: El Arenal (J1), Zapotlán El Grande (J2), Ahualulco de Mercado (J3), Tlajomulco de Zúñiga (J4), Arandas (J5), Tala (J6), Zapotiltic (J7) y Tecalitlán (J8); de un municipio de Michoacán: Los Reyes de Salgado (M1) y de un municipio de Colima: Villa de Álvarez (C1) (Figura 10).

El método utilizado para realizar el muestreo fue el de cinco de oros, es decir se tomaron muestras de los cuatro extremos y una del centro de cada predio (SENASICA, 2012). Se identificaron los síntomas característicos del cáncer de tallo, los cuales consisten en muerte regresiva de ramillas terminales, lesiones superficiales en el tallo e identificación de acérvulos. El tejido se colocó en papel húmedo y se almacenó en una hielera. Bajo estas condiciones se mantuvo hasta el inicio del aislamiento del hongo, con el fin de evitar su deterioro y facilitar el aislamiento del patógeno.

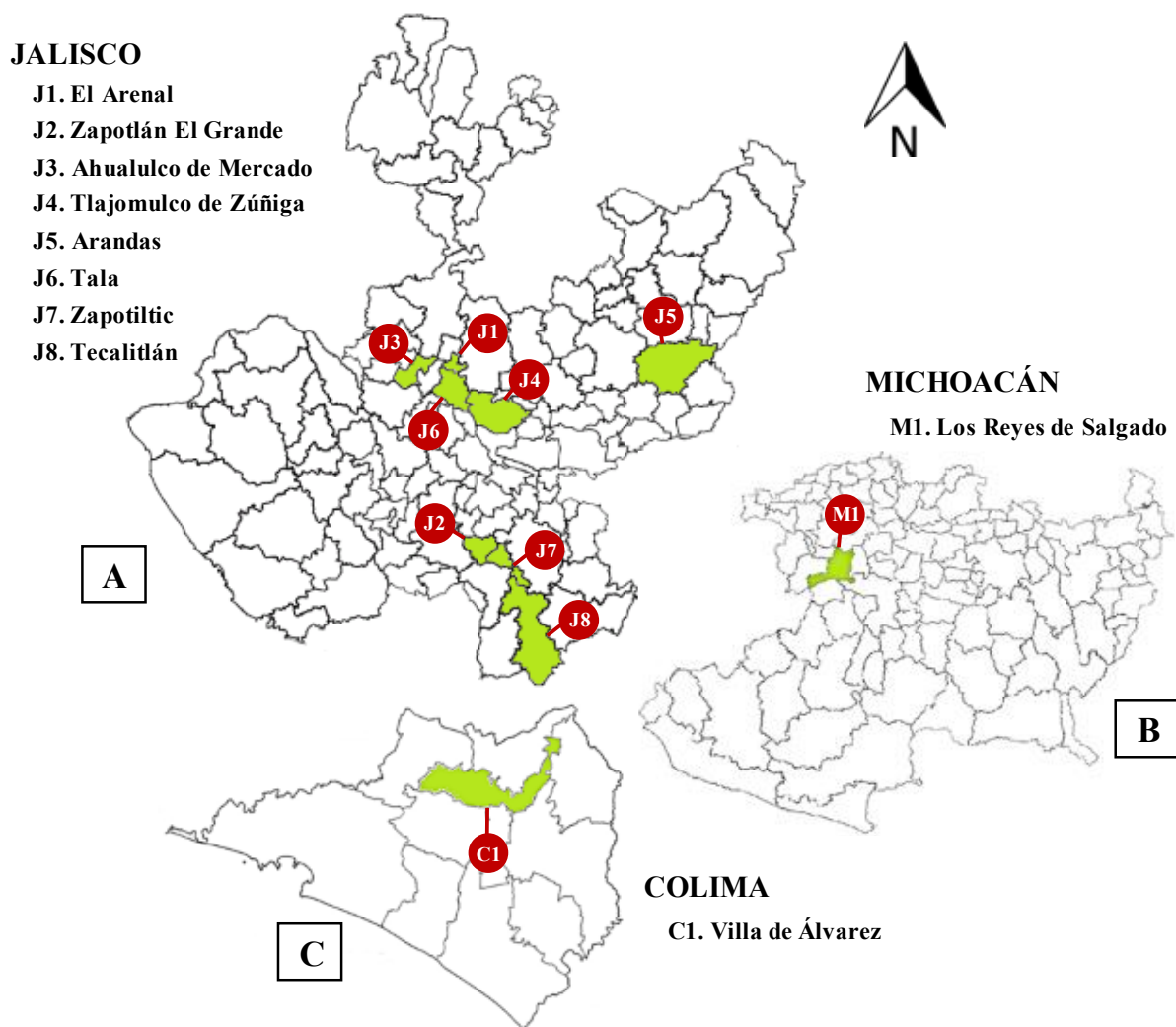


Figura 10. Estados y municipios del occidente de México en los que se llevó a cabo el muestreo de plantas de arándano con cáncer de tallo. Jalisco (A). Michoacán (B). Colima (C).

## 6.2. Aislamiento de *Pestalotiopsis* spp.

Se cortaron fragmentos de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> de tejido de tallo que correspondía a la zona de avance de la lesión. Los tejidos se desinfectaron con NaClO al 3% durante 45 s, se lavaron dos veces con agua destilada estéril y se retiró el exceso de humedad con papel estéril, enseguida se colocaron cinco porciones de tejido por placa de Petri, que contenía medio PDA

marca BD BIOXON™. Las placas de Petri se incubaron a 25 °C en oscuridad y se revisó su crecimiento hasta obtener un radio micelial aproximado de 1 cm, posteriormente se transfirió el micelio a una nueva placa con medio PDA y se incubó bajo las mismas condiciones hasta que el crecimiento micelial alcanzara el total de la placa y el hongo desarrollara estructuras de reproducción para su posterior caracterización morfológica macroscópica y microscópica (Hu *et al.*, 2007; Espinoza *et al.*, 2008) (Figura 11).

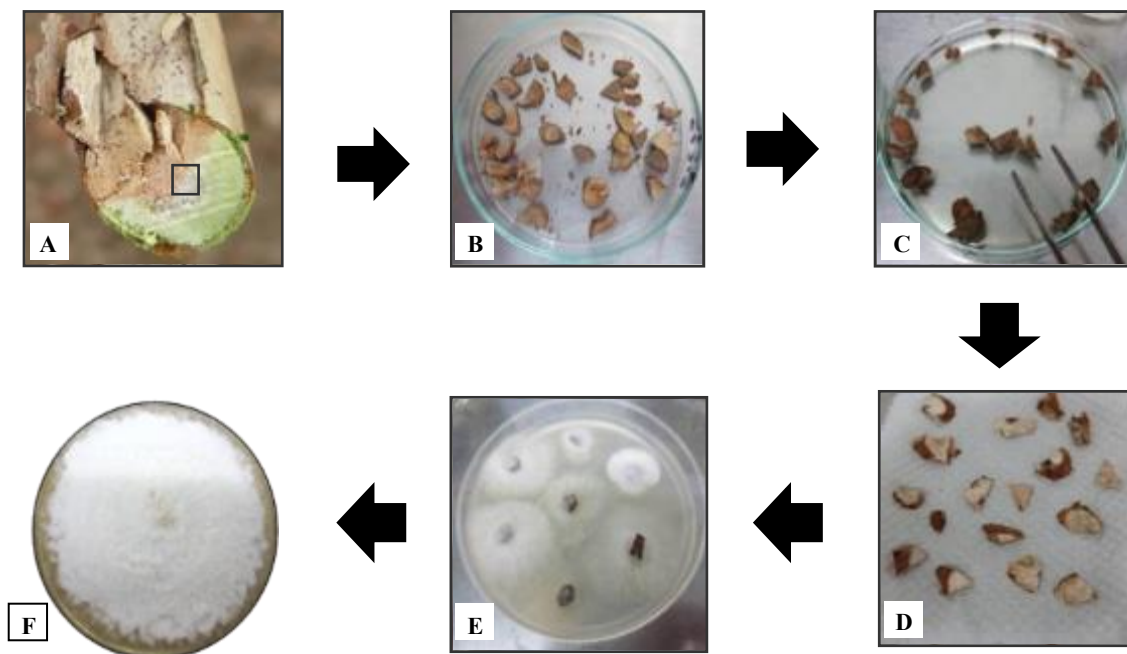


Figura 11. Esquema representativo del aislamiento del patógeno de plantas con cáncer de tallo procedentes de Jalisco, Colima y Michoacán. Corte transversal de un tallo de arándano con cáncer (A). Fragmentos de tejido vegetal de la zona de avance de la lesión (B). Desinfección de los fragmentos de tejido vegetal (C). Secado de los fragmentos de tejido vegetal (D). Crecimiento micelial de *Pestalotiopsis* spp. en medio PDA después de 2 d a 25 °C (E). Colonia característica de *Pestalotiopsis* spp. después de 7 d de crecimiento a 25 °C en medio PDA (F).

### 6.3. Caracterización morfológica de *Pestalotiopsis* spp.

La morfología de 26 aislados de *Pestalotiopsis* spp. fue evaluada, de los cuales 19 fueron provenientes de Jalisco, 4 de Colima y 2 de Michoacán. Los parámetros de caracterización macroscópica y microscópica se obtuvieron siguiendo los resultados de los estudios de Jeewon *et al.* (2003), Liu *et al.* (2010) y Maharachchikumbura *et al.* (2011).

#### 6.3.1. Caracterización morfológica macroscópica

La caracterización morfológica macroscópica consistió en determinar el color de la colonia, tipo de micelio y presencia de acérvulos. Tres discos de micelio de 1 cm fueron tomados de cada aislamiento del hongo y se colocaron en tres placas de Petri que contenían medio PDA; las placas se incubaron durante 10 d a 25 °C en oscuridad. Después de la incubación se registraron las características de cada aislado y se reportó la mediana como característica predominante de la colonia fúngica (Figura 12).

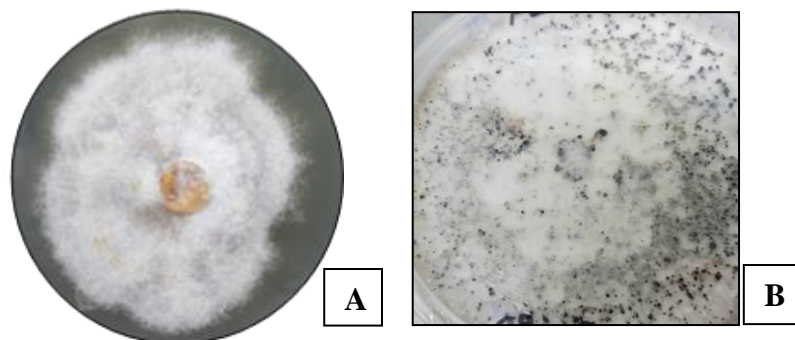


Figura 12. Colonia típica de *Pestalotiopsis* sp. Anverso de la colonia (A). Presencia de acérvulos abundantes en la colonia fúngica (B).



### 6.3.2. Caracterización morfológica microscópica

Para la caracterización microscópica se realizó un montaje de conidios con KOH 0.1 M de cada uno de los aislados a partir de cultivos de 10 d que presentaron estructuras jóvenes. Se utilizó un microscopio óptico y con ayuda del software AxioVision Rel. 4.8 se midieron 20 conidios por aislado. Para cada uno se registró el número de células, la coloración de las células medias del conidio (concoloro o versicoloro), el largo, ancho, número y longitud de ornamentaciones apicales y basales (Cuadro 1). Con la matriz de datos se realizó un ACP mediante el programa NTSYSpc versión 2.21h.

**Cuadro 1. Variables registradas en la caracterización morfológica microscópica de conidios de *Pestalotiopsis* spp.**

Variable medida	Abreviatura
Número de células	NDC
Coloración de las células centrales: Concoloras/Versicoloras	C/V
Largo del conidio	LAR
Acho del conidio	ANC
Número de ornamentaciones apicales	NOA
Longitud de la ornamentación apical 1	OA1
Longitud de la ornamentación apical 2	OA2
Longitud de la ornamentación apical 3	OA3
Longitud de la ornamentación apical 4	OA4
Número de ornamentaciones basales	NOB
Longitud de la ornamentación basal 1	OB1

#### 6.4. Pruebas de patogenicidad

Se utilizaron 3 tallos de plantas asintomáticas de arándano variedad Biloxi de 1 año de edad, los cuales se desinfectaron con NaClO al 0.5% durante 1 min y etanol al 0.5% por 45 s. Los tallos se lavaron con agua destilada estéril durante 2 min y se retiró el exceso de humedad con papel estéril. A los tallos de 20 cm de longitud se les hizo una lesión de 4 mm de diámetro con un sacabocados estéril. Se inocularon 13 aislados de *Pestalotiopsis* sp. provenientes de Jalisco, Colima y Michoacán. Como control negativo se inoculó *Fusarium* sp. Para la inoculación, los aislados se colocaron en crecimiento en medio PDA a 25 °C durante 7 d, luego se tomó un disco de micelio de 4 mm de diámetro y se colocó en el tallo. Como control absoluto se inocularon 3 tallos con un disco de medio PDA (Figura 13). El desarrollo de la lesión se midió a los 2, 4, 5, 6 y 12 d después de la inoculación y con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias de Tukey con una  $P < 0.05$  en el programa estadístico Minitab® 17. Transcurridos 12 d después de la inoculación se realizó un reaislamiento del hongo en medio PDA para comprobar que correspondía al microorganismo inoculado.

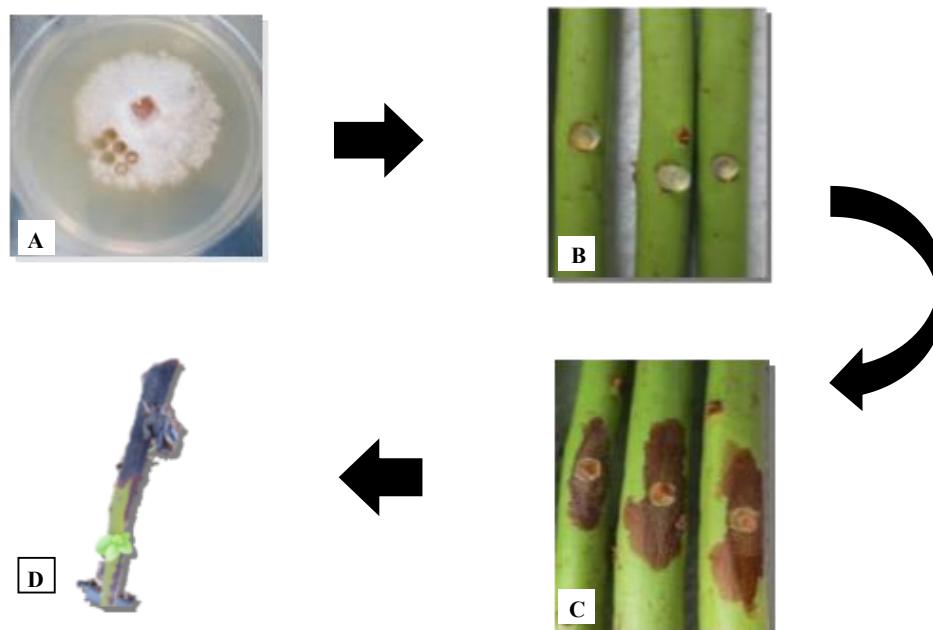


Figura 13. Esquema representativo de las pruebas de patogenicidad realizadas con 13 aislados de *Pestalotiopsis* spp. procedentes de Jalisco, Colima y Michoacán. Discos de micelio de *Pestalotiopsis* spp con un diámetro de 4 mm (A). Inoculación de tallos de arándano con discos de micelio de *Pestalotiopsis* spp. y *Fusarium* sp. (B). Tallos de arándano con una lesión necrótica después de 5 d de la inoculación (C). Tallo con cáncer asociado a *Pestalotiopsis* spp. proveniente de campo (D).

### 6.5. Caracterización molecular de *Pestalotiopsis* spp.

La caracterización molecular se llevó a cabo con 34 aislados de *Pestalotiopsis* spp., 25 provenientes de Jalisco, 7 de Colima y 2 de Michoacán. Como control negativo se utilizó a *Macrophomina phaseolina*, patógeno de frijol.

### **6.5.1. Extracción de ADN genómico**

Los aislados de *Pestalotiopsis* spp. y *Macrophomina phaseolina* se cultivaron en placas con medio PDA a 25 °C durante 7 d (Liu *et al*, 2007). El micelio fue colectado directamente del medio de cultivo con ayuda de una espátula estéril y se colocó en tubos de 1.5 mL. Los tubos con el micelio del hongo se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C. Posteriormente, el micelio congelado se pulverizó en un mortero estéril con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, del cual se depositaron aproximadamente 200 mg en un tubo de 1.5 mL. La extracción de ADN fue realizada mediante el sistema AxyPrep™ Multisource Genomic DNA Miniprep y de acuerdo a las indicaciones del fabricante (AXYGEN Biosciences®). El ADN obtenido se mantuvo a -20 °C hasta su posterior uso.

### **6.5.2. Electroforesis de ADN genómico**

El ADN genómico se resolvió en geles de agarosa al 1% p/v en regulador TAE (Tris Acetato 40 mM y EDTA 1 mM) y teñidos con GelRed™ (0.05 µL mL<sup>-1</sup> TAE-agarosa 1%). A cada muestra de ADN se le añadió regulador de carga (glicerol 50%, EDTA 1 mM y azul de bromofenol 0.25%). Los geles se sometieron a una electroforesis con regulador TAE 1X a 70 V durante 40 min. Los marcadores de tamaño molecular empleados fueron 1 Kb plus de Invitrogen™ e HyperLadder™ 1Kb de Bionline®. Los geles se visualizaron en un fotodocumentador de Bio-Rad® con el programa Quantity One® versión 4.6.8.

### **6.5.3. Inter Secuencias Simples Repetidas (ISSR)**

La amplificación de los fragmentos de ADN analizados se llevó a cabo mediante PCR en un termociclador NYX TECHNIK™. Se empleó el sistema Biomix™ de Bionline® para un volumen final de reacción de 25 µL. La mezcla de reacción contenía: 12.5 µL de Biomix™, 1 µL de oligonucleótidos (10 pM), 1 µL de ADN (100 ng) y 10.5 µL de agua estéril. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un ciclo inicial de desnaturalización a

94 °C durante 4 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 1 min; alineamiento de los oligonucleótidos según corresponda, durante 1 min y una extensión a 72 °C durante 2 min, finalmente una extensión a 72 °C durante 5 min. Los productos de PCR obtenidos fueron almacenados a -20 °C. Previamente se realizaron ensayos de PCR con 28 pares de oligonucleótidos y 3 aislados; de acuerdo al nivel de polimorfismo obtenido, se eligieron 8 pares para el análisis mediante ISSR con los 34 aislados. La secuencia de cada uno de los 8 pares de oligonucleótidos se muestra en el cuadro 2.

Los fragmentos amplificados fueron resueltos mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.1% p/v en regulador TAE 1X y teñidos con GelRed™ (0.05 µL mL<sup>-1</sup> TAE-agarosa 1%). A cada muestra se le agregó regulador de carga (6X) antes de ser depositada en el gel de agarosa (glicerol 50%, EDTA 1 mM y azul de bromofenol 0.25%). Los geles se sometieron a una electroforesis en regulador TAE 1X a 70 V durante 2 h a 18 °C. Los marcadores de tamaño molecular empleados fueron 1 Kb plus de Invitrogen™ e HyperLadder™ 1Kb de Bioline®. Los geles se visualizaron en un fotodocumentador de Bio-Rad® con el programa Quantity One® versión 4.6.8.

**Cuadro 2. Oligonucleótidos utilizados en la caracterización molecular de *Pestalotiopsis* spp. mediante ISSR.**

Nombre del Oligonucleótido	Secuencia del Oligonucleótido (5'→3')	Temperatura de alineamiento (°C)
OL1	TGC(AC) <sub>6</sub>	42.0
OL2	(AG) <sub>8</sub> C	47.0
OL3	(GA) <sub>8</sub> YG	50.0
OL4	DBD(AC) <sub>7</sub> A	44.0
OL5	(GA) <sub>8</sub> YC	45.7
OL6	C(AC) <sub>7</sub> AG	50.0
OL7	HVHT(GT) <sub>7</sub>	53.0
OL8	VHV(GT) <sub>7</sub> G	60.0

**Y= C o T; D= A, G o T; B= C, G o T, H= A, C o T y V= A, C o G.**

#### 6.5.4. Análisis de datos moleculares

Con ayuda del programa Quantity One<sup>®</sup> versión 4.6.8 de Bio-Rad<sup>®</sup> se determinó el patrón de bandeo obtenido con los ocho pares de oligonucleótidos para cada individuo. Con el análisis de bandeo se realizó una matriz binaria de presencia/ausencia de bandas. El porcentaje de polimorfismo fue calculado para cada oligonucleótido, considerando como banda monomórfica aquella que estuviera presente al menos en el 95% de los individuos.

El coeficiente de similitud de Jaccard fue calculado (Mattioni *et al.*, 2002), seguido de un análisis de agrupamiento de los datos por el método UPGMA mediante el programa InfoGene versión 2016.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1. Muestreo de plantas de arándano con cáncer de tallo y aislamiento de *Pestalotiopsis* spp.

La colecta de plantas con cáncer de tallo se llevó a cabo a partir del mes de agosto del año 2015 al mes de marzo del 2016. Se colectaron 204 plantas con los síntomas característicos del cáncer de tallo. Posteriormente se realizó el aislamiento del hongo y se obtuvieron 51 aislados de *Pestalotiopsis* spp. provenientes de Jalisco, 6 de Michoacán y 11 de Colima. La colecta de plantas enfermas muestra que en algunos casos a pesar de la cantidad de plantas procesadas para el aislamiento, no se logró obtener una cantidad elevada de aislados, lo cual se debió al estado de deshidratación del tejido ocasionado por el mismo patógeno (Cuadro 3).

**Cuadro 3. Estados y municipios de la zona occidente de México, en los que se realizó el muestreo de plantas de arándano variedad Biloxi con cáncer de tallo.**

Estado	Municipio	Código del municipio	Número de Plantas	Número de Aislados
<b>Jalisco</b>	El Arenal	J1	8	12
	Zapotlán El Grande	J2	29	7
	Ahualulco de Mercado	J3	15	8
	Tlajomulco de Zúñiga	J4	51	11
	Arandas	J5	37	10
	Tala	J6	7	3
	Zapotiltic	J7	12	0
	Tecalitlán	J8	8	0
	<b>Total</b>			<b>167</b>
<b>Michoacán</b>	Los Reyes de Salgado	M1	23	6
<b>Colima</b>	Villa de Álvarez	C1	14	11
<b>Total</b>			<b>204</b>	<b>68</b>

## 7.2. Caracterización morfológica macroscópica de aislados de *Pestalotiopsis* spp.

La caracterización morfológica macroscópica del hongo dio como resultado que la mediana del color de la colonia fue blanco en los tres estados. El tipo de micelio fue algodonoso en los aislados de Jalisco y Michoacán, mientras que en los aislados de Colima fue afelpado. La presencia de acérvulos fue abundante en los aislados de Jalisco y Michoacán, así como escasos en los aislados de Colima (Figura 14) (Cuadro 4).

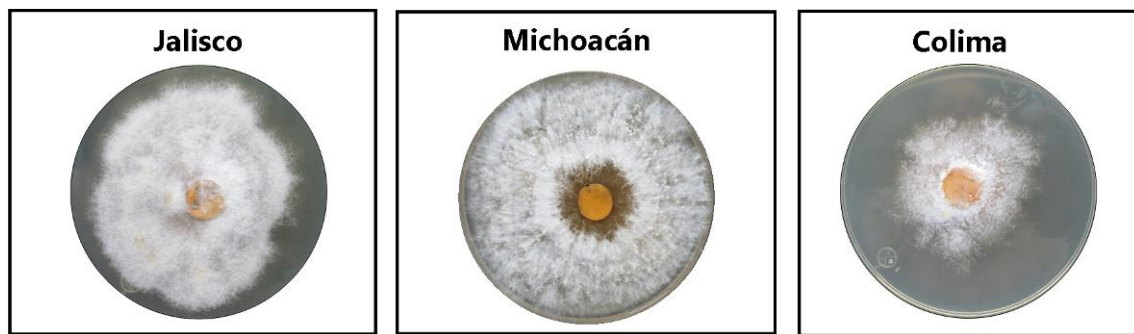


Figura 14. Caracterización macroscópica de algunos aislados de *Pestalotiopsis* spp. provenientes de Jalisco, Michoacán y Colima.



**Cuadro 4. Caracterización morfológica macroscópica de 26 aislados de *Pestalotiopsis* spp. procedentes de Jalisco (J1 a J6), Colima (C1) y Michoacán (M1).**

<b>Aislado</b>	<b>Color de la colonia</b>	<b>Tipo de micelio</b>	<b>Cantidad de acérvulos</b>
MLPE09J1	Blanco	Algodonoso	Abundantes
MLPE11J1	Blanco	Algodonoso	Abundantes
MLPE12J1	Blanco	Afelpado	Escasos
MLPE17J2	Blanco	Afelpado	Escasos
MLPE22J1	Blanco	Algodonoso	Abundantes
MLPE28J3	Blanco	Algodonoso	Abundantes
MLPE29J3	Blanco	Algodonoso	Abundantes
MLPE33J3	Blanco	Algodonoso	Abundantes
MLPE40J4	Blanco	Algodonoso	Abundantes
MLPE42J4	Blanco	Algodonoso	Abundantes
MLPE55J5	Blanco	Algodonoso	Abundantes
MLPE56J5	Blanco	Algodonoso	Abundantes
MLPE57J5	Blanco	Algodonoso	Abundantes
MLPE58J5	Blanco	Algodonoso	Abundantes
MLPE59J5	Blanco	Algodonoso	Abundantes
MLPE60J5	Blanco	Algodonoso	Abundantes
MLPE61J2	Blanco	Algodonoso	Abundantes
MLPE64J6	Blanco	Algodonoso	Abundantes
MLPE65J6	Blanco	Algodonoso	Abundantes
MLPE66J6	Blanco	Algodonoso	Abundantes
MLPE46C1	Blanco	Afelpado	Escasos
MLPE47C1	Blanco	Afelpado	Escasos
MLPE49C1	Blanco	Afelpado	Escasos
MLPE52C1	Blanco	Algodonoso	Abundantes
MLPE01M1	Blanco	Algodonoso	Abundantes
MLPE03M1	Blanco	Algodonoso	Abundantes

Los resultados de la caracterización macroscópica del hongo coinciden con los reportados para el género *Pestalotiopsis* (Steyaert, 1953; Maharachchikumbura *et al.*, 2012). Solo la presencia de escasos acérvulos del hongo, en algunos aislados de Jalisco y Colima, podría deberse a la respuesta de ciertos hongos en cultivo *in vitro*, el cual se caracteriza por contener suficiente fuente de carbono y el hongo retarda su ciclo de vida o no lo realiza por completo hasta agotar dichas fuentes (García *et al.*, 2006).

Los aislados de *Pestalotiopsis* spp. con escasos acérvulos mostraron el mismo comportamiento aún después de ser colocados para su crecimiento en medio con baja concentración de carbono, lo cual coincide con lo reportado por García *et al.* (2006) y Hu *et al.* (2007), en donde señalan que el subcultivo de los hongos en repetidas ocasiones puede inhibir la producción de cuerpos fructíferos y variar las características de la colonia.

### **7.3. Caracterización morfológica microscópica de aislados de *Pestalotiopsis* spp.**

El resultado de la caracterización morfológica microscópica se reporta de acuerdo a su media muestral. Los conidios presentaron 5 células, 2 hialinas en los extremos y 3 versicoloras en el centro. La longitud por el ancho del conidio en los tres estados, fue de 23.70 por 6.75  $\mu\text{m}$ , 23.55 por 7.70  $\mu\text{m}$  y 23.12 por 6.86  $\mu\text{m}$ , para Jalisco, Colima y Michoacán respectivamente. El número de ornamentaciones apicales fue de 2.78, 3.36 y 3.35 para Jalisco, Colima y Michoacán respectivamente. Su longitud varió de 16.26 a 31.45  $\mu\text{m}$  en la población general. El número de ornamentaciones basales fue de 0.99, 1.00 y 0.90 para Jalisco, Colima y Michoacán respectivamente. La longitud de la ornamentación basal fue de 7.93, 7.29 y 7.45  $\mu\text{m}$  para Jalisco, Colima y Michoacán respectivamente (Figuras 15 y 16).

La caracterización morfológica microscópica no fue posible realizarla en ocho aislados (MLPE43J4, MLPEA07J5, MLPEA18J5, MLPEA20J5, MLPEA51J5, MLPE452C1, MLPE453C1, MLPE54C1), debido a la escasa presencia de acérvulos, solo se observaron conidios de cinco células, tres células pigmentadas en el centro y dos hialinas en los extremos.

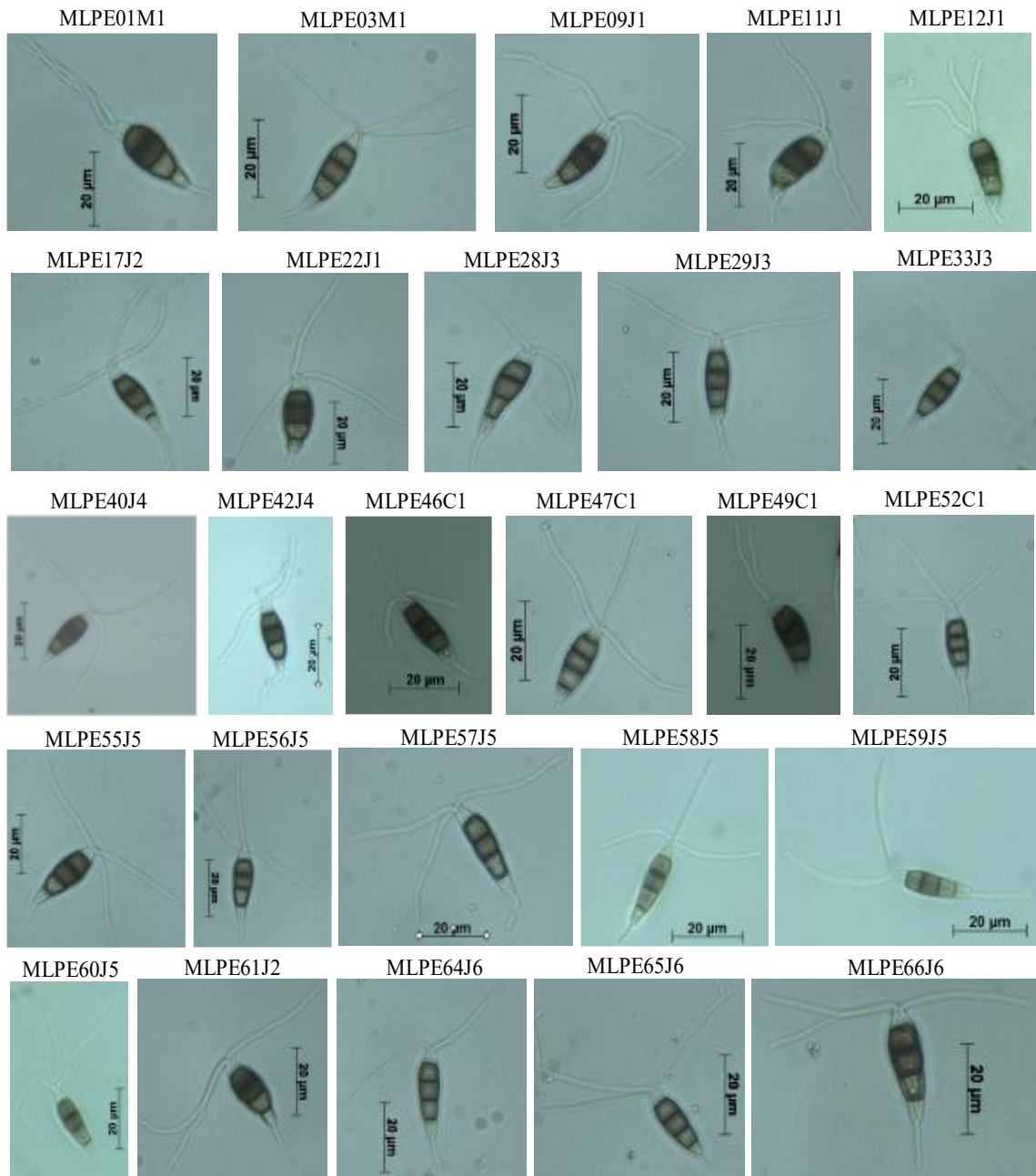


Figura 15. Caracterización microscópica de 26 aislados de *Pestalotiopsis* spp. provenientes de Jalisco (J1 a J6), Colima (C1) y Michoacán (M1).

**Caracterización microscópica de aislados de *Pestalotiopsis* spp. provenientes de Jalisco, Colima y Michoacán**

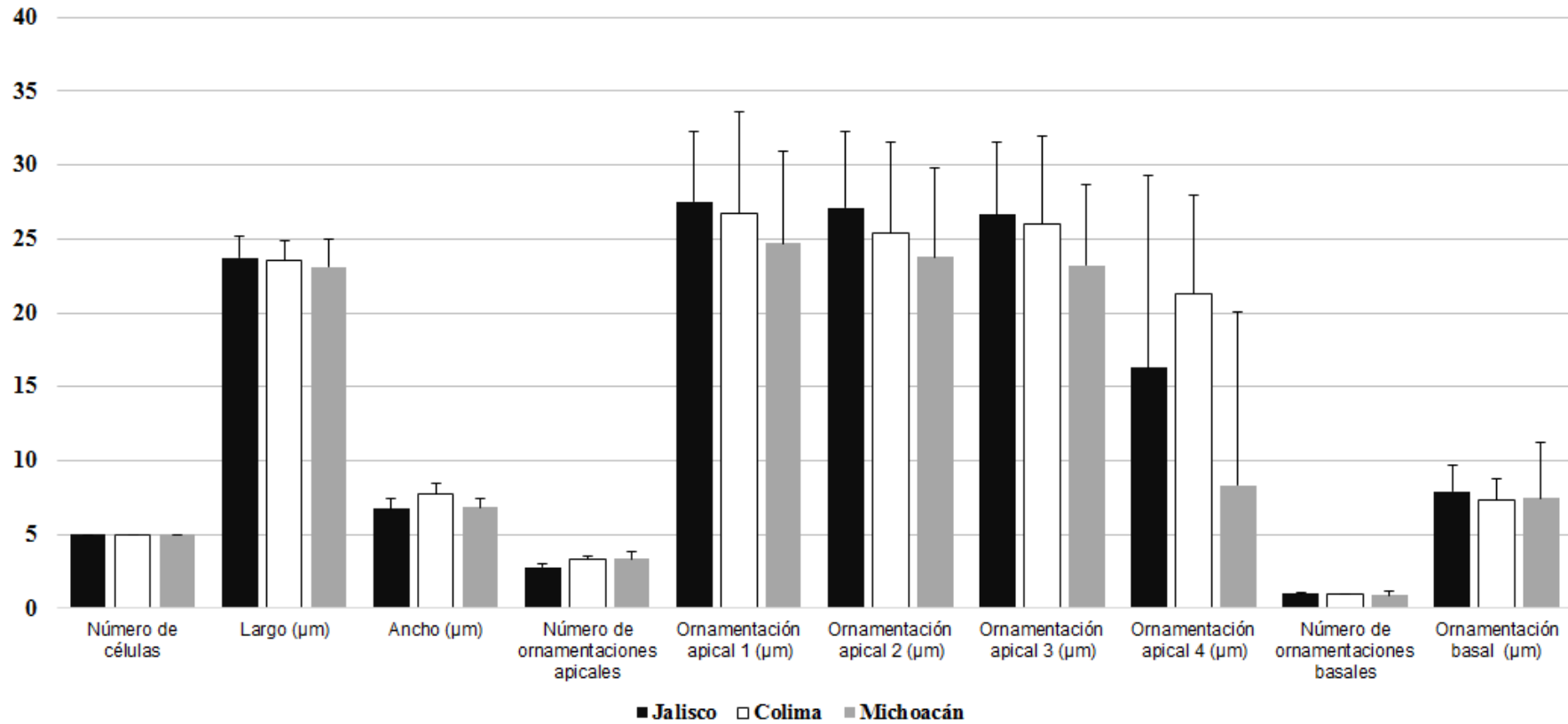


Figura 16. Variables registradas en la caracterización morfológica microscópica de 26 aislados de *Pestalotiopsis* spp. provenientes de Jalisco, Colima y Michoacán. La línea sobre la barra indica la desviación estándar.

#### **7.4. Análisis de componentes principales**

El ACP mostró que el porcentaje de la varianza explicada fue del 77.07 para los primeros tres componentes, con un valor propio menor a 1.18 (Cuadro 5). El componente principal 1 (CP1) explicó el 44.18% de la varianza total y fue determinado por las variables: longitud de las ornamentaciones apicales 1, 2, 3 y 4. El componente principal 2 (CP2) explicó el 19.69% de la varianza total y las variables que influyeron son: largo del conidio, ancho del conidio, número de ornamentaciones apicales y la longitud de la ornamentación basal. Finalmente el componente principal 3 (CP3) explicó el 13.22% de la variabilidad total y fue determinado por las mismas variables del CP2 (Cuadro 6) (Figura 17).

La distribución morfológica de los aislados de *Pestalotiopsis* spp. mostró la formación de tres grupos. El grupo I se caracteriza por presentar conidios de mayor longitud y una ornamentación basal más larga que el resto de aislados, el origen de los aislados corresponde a los tres estados. El grupo II se define por conidios con las ornamentaciones apicales de mayor longitud y agrupa aislados de los tres estados. Por último, el grupo III se caracteriza por presentar conidios más anchos y de mayor número de ornamentaciones apicales, el origen de los aislados corresponde solo al estado de Jalisco (Figura 18).

**Cuadro 5. Resultado del análisis de componentes principales: valores propios, varianza absoluta y varianza acumulada obtenidos con base en la matriz de correlaciones de 9 variables cuantitativas de 26 aislados de *Pestalotiopsis* spp. provenientes de Jalisco, Colima y Michoacán.**

Componente principal	Valor propio	Varianza absoluta	Varianza acumulada
1	3.9758	44.1751	44.1751
2	1.7717	19.6857	63.8608
3	1.1895	13.2162	77.0770
4	0.9205	10.2283	87.3054
5	0.5910	6.5671	93.8725
6	0.2994	3.3267	97.1992
7	0.1628	1.8094	99.0086
8	0.0665	0.7385	99.7471
9	0.0228	0.2529	100

**Cuadro 6. Vectores característicos de las variables de mayor valor descriptivo, respecto a su componente principal de 26 aislados de *Pestalotiopsis* spp. provenientes de Jalisco, Colima y Michoacán.**

Variable	Componentes Principales (CP)		
	CP1	CP2	CP3
LAR	0.390	<b>0.660</b>	<b>0.455</b>
ANC	0.473	<b>-0.462</b>	<b>0.563</b>
NOA	0.441	<b>-0.668</b>	<b>0.438</b>
OA1	<b>0.908</b>	0.165	-0.228
OA2	<b>0.923</b>	0.174	-0.266
OA3	<b>0.923</b>	0.197	-0.155
OA4	<b>0.793</b>	-0.262	0.077
NOB	-0.488	0.212	0.315
OB1	0.109	<b>0.682</b>	<b>0.470</b>
<b>Valor propio</b>	<b>4.472</b>	<b>0.698</b>	<b>1.669</b>

LAR: largo del conidio. ANC: ancho del conidio. NOA: número de ornamentaciones apicales. OA1 a OA4: longitud de las ornamentaciones apicales 1 a la 4. NOB: número de ornamentaciones basales. OB1: longitud de la ornamentación basal 1.

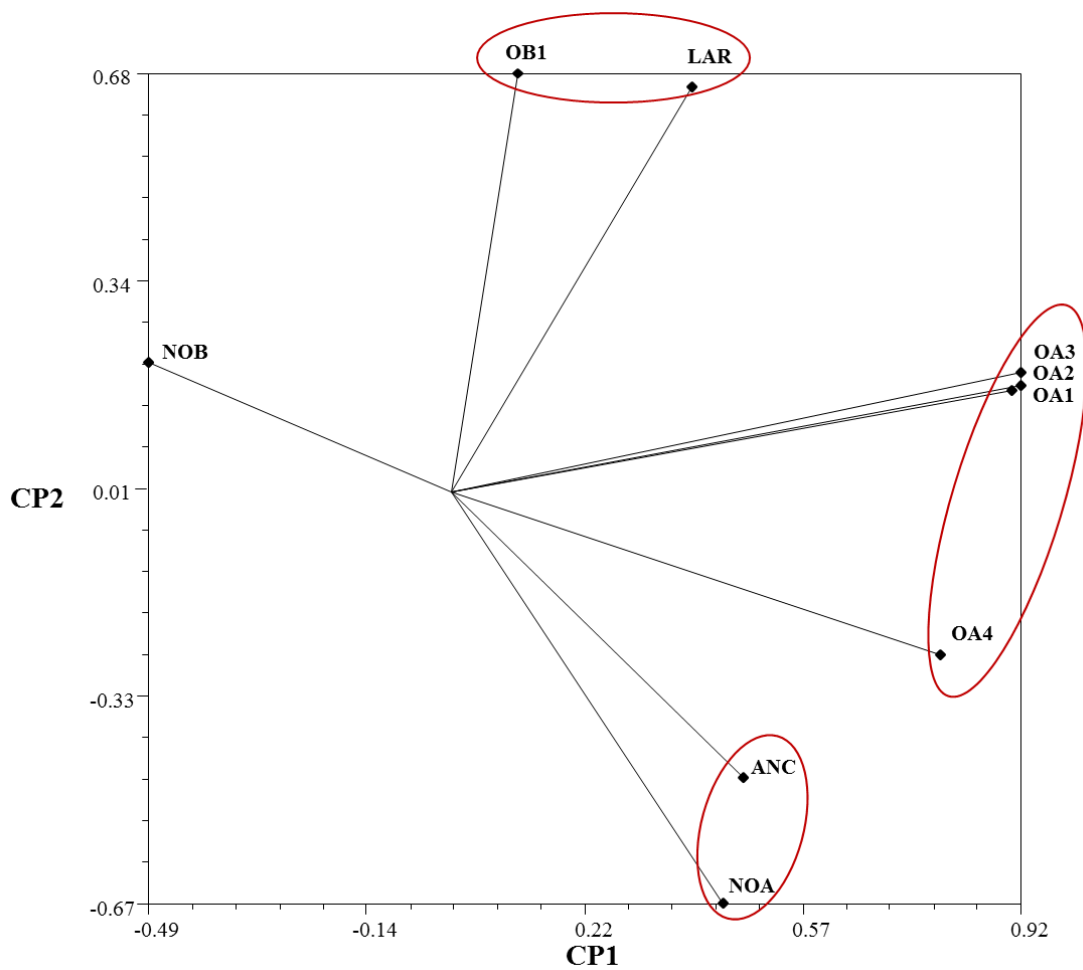


Figura 17. Variables de mayor valor descriptivo en función de los dos primeros componentes principales, obtenidos con la matriz de correlación de nueve variables. LAR: largo del conidio. ANC: ancho del conidio. NOA: número de ornamentaciones apicales. OA1 a OA4: longitud de las ornamentaciones apicales 1 a la 4. NOB: número de ornamentaciones basales. OB1: longitud de la ornamentación basal 1.



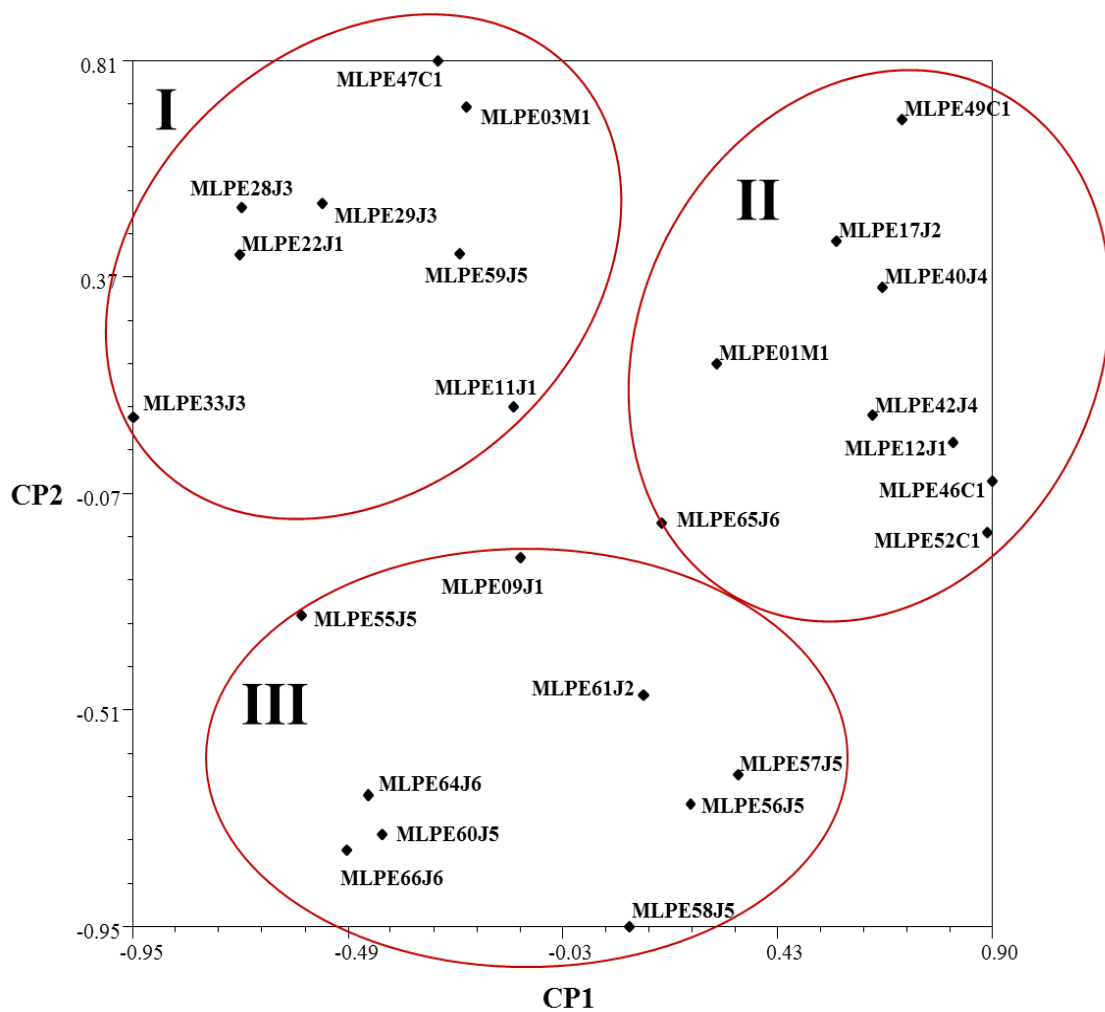


Figura 18. Distribución de la diversidad morfológica de 26 aislados de *Pestalotiopsis* spp. provenientes de Jalisco (J1 a J6), Colima (C1) y Michoacán (M1) en función de los dos primeros componentes principales, obtenidos con la matriz de correlación de las nueve variables.

Debido a la poca variación de la coloración de las células centrales y en general a las variables microscópicas de los conidios, se puede inferir que es una sola especie. De acuerdo a Steyaert (1953) y Maharachchikumbura *et al.* (2011) la especie de este hongo corresponde a *Pestalotiopsis clavispora*, ya que los conidios mostraron cinco células, tres veriscoloras en el centro y dos hialinas en los extremos; tres ornamentaciones apicales y una basal. En su trabajo Espinoza *et al.* (2008) reportan la presencia de *P. clavispora* en plantas de 2 a 3 años de edad, lo cual coincide con las plantas colectadas en este estudio. Por otro lado, el ACP mostró que la longitud de las ornamentaciones apicales eran las variables de mayor aporte de información, de acuerdo a la varianza explicada; lo cual indica que las variables que determinan las diferencias entre especies, como lo es el patrón de coloración de las células medias se mantuvo constante, esto se debe a la variación intraespecífica y no interespecífica (Liu *et al.*, 2007; 2010).

Los resultados obtenidos de la caracterización morfológica macroscópica y microscópica no son suficientes para determinar las especies fúngicas que están asociadas al cáncer de tallo de arándano, ya que no se cuenta con la caracterización morfológica del total de aislados, por lo que se tendrían que realizar análisis de secuencias de la región ITS y del gen de la  $\beta$ -tubulina para obtener mayor información acerca de las especies que causan esta enfermedad (Jeewon *et al.*, 2002; 2003; Hu *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2010; Maharachchikumbura *et al.*, 2011; 2012; 2014b).

## 7.5. Pruebas de patogenicidad

El resultado de las pruebas de patogenicidad mostró que los 13 aislados causaron una lesión necrótica, con presencia de micelio y algunos acérvulos. Todos estos síntomas se comenzaron a observar el día 3 después de la inoculación, pero fueron más evidentes el día 5; en donde la longitud de la lesión varió de 7.67 a 37.00 mm en promedio (Cuadro 7) (Figura 19).

**Cuadro 7. Pruebas de patogenicidad realizadas en tallos de arándano variedad Biloxi con 13 aislados de *Pestalotiopsis* spp. provenientes de Jalisco, Colima y Michoacán.**

Aislado	Día 2 (mm)		Día 4 (mm)		Día 5 (mm)		Día 6 (mm)		Día 12 (mm)	
	Media	Desviación Estándar	Media	Desviación Estándar	Media	Desviación Estándar	Media	Desviación Estándar	Media	Desviación Estándar
MLPE01M1	6.33	1.15	17.00	5.57	25.33	7.64	31.33	9.61	74.33	20.43
MLPE09J1	5.33	0.58	7.33	1.53	7.70	1.53	7.67	1.53	9.67	4.73
MLPE17J2	6.33	1.15	27.00	6.24	37.00	11.53	45.33	18.61	149.33	87.76
MLPE22J1	7.00	2.65	19.67	7.51	26.33	12.01	32.67	16.62	73.67	45.37
MLPE36J4	6.33	0.58	24.00	5.57	34.33	4.04	39.00	2.65	96.33	14.15
MLPE52C1	7.00	0.00	21.67	6.11	31.67	8.50	38.67	12.90	115.00	74.10
MLPE54C1	7.00	1.73	22.67	4.62	28.33	1.15	34.33	2.52	89.00	1.73
MLPE55J5	5.67	0.58	20.33	4.73	22.00	2.00	23.00	2.65	52.00	29.82
MLPE56J5	5.33	0.58	14.67	3.21	14.67	3.21	18.00	5.57	29.33	14.57
MLPE61J2	5.00	0.00	19.00	1.73	19.00	1.73	21.33	1.15	43.33	21.39
MLPE64J6	5.33	0.58	25.00	5.57	25.00	5.57	31.33	9.24	110.67	84.11
MLPE65J6	5.33	1.53	24.33	4.04	24.33	4.04	30.00	7.81	99.67	87.52
MLPE66J6	5.67	0.58	28.67	12.50	28.67	12.50	33.00	16.09	150.67	85.45
<i>Fusarium</i> sp.	4.00	0.00	5.00	0.00	5.00	0.00	5.00	0.00	5.00	0.00
Testigo	4.00	0.00	6.67	0.58	6.67	0.58	6.67	0.58	7.33	1.53

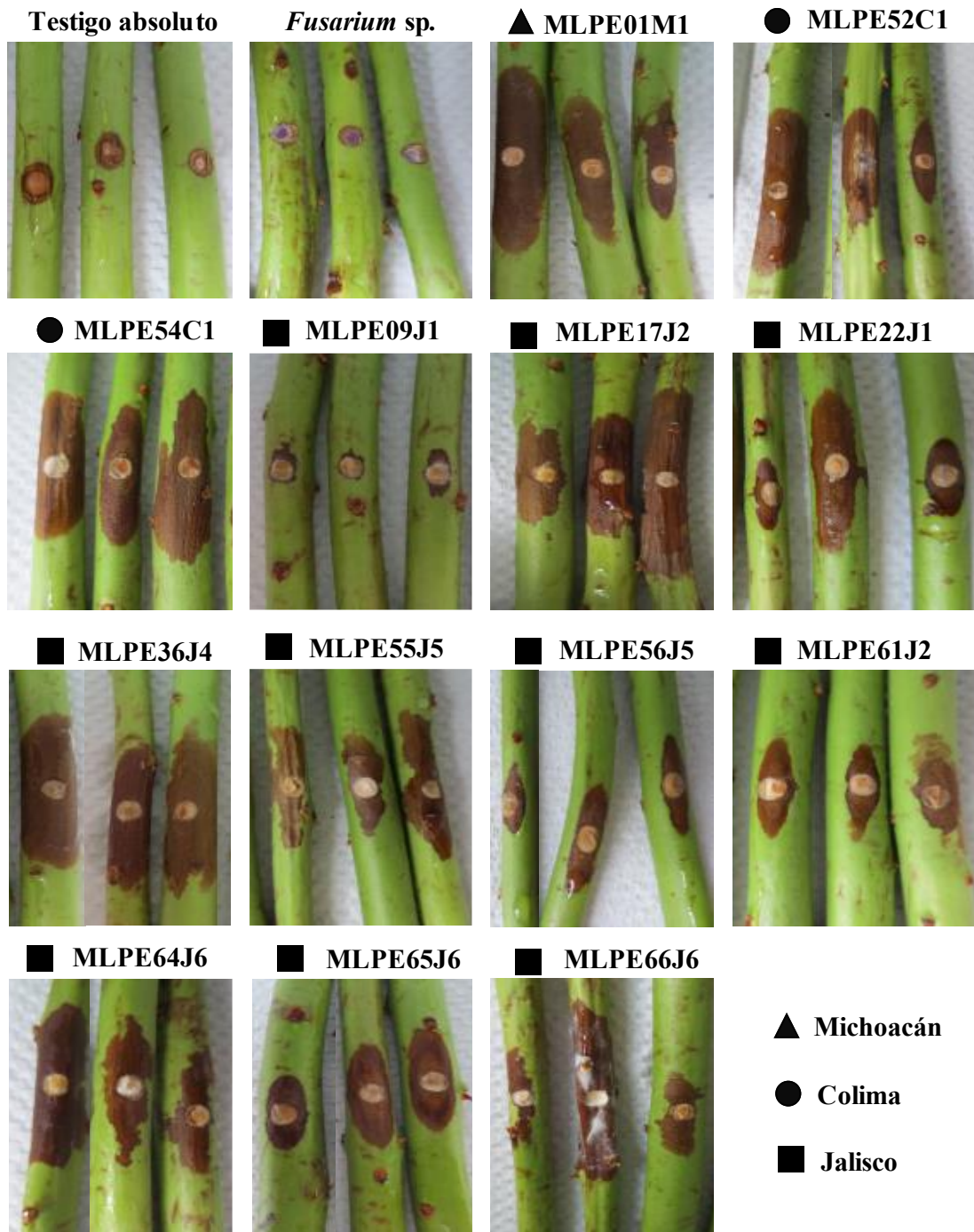


Figura 19. Pruebas de patogenicidad realizadas en tallos de arándano variedad Biloxi con 13 aislados de *Pestalotiopsis* spp. provenientes de Jalisco (J1 a J6), Colima (C1) y Michoacán (M1). Además de un testigo negativo: *Fusarium* sp. y un testigo absoluto. Las lesiones mostradas fueron después de 5 d de la inoculación con el hongo.

Para el análisis estadístico, se tomaron los datos de tallos infectados después de 5 d, ya que se determinó que los síntomas eran muy similares a los observados en predios comerciales. El análisis de varianza y la prueba de comparación de medias de Tukey, indican la formación de 4 grupos, pero sólo los aislados MLPE17J2, MLPE36J4, MLPE52C1, MLPE66J6 y MLPE54C1 fueron estadísticamente diferentes al testigo absoluto y a *Fusarium* sp. Lo anterior señala que aunque los aislados MLPE22J1, MLPE01M1, MLPE64J6, MLPE65J6, MLPE55J5, MLPE61J2, MLPE56J5 y MLPE09J1 causaron una lesión necrótica en el tallo de arándano, presentan un nivel de virulencia menor. De esta forma los grupos estadísticos representan grados de virulencia, el aislado más virulento fue MLPE17J2, procedente de Jalisco. Los aislados que mostraron virulencia media alta fueron MLPE36J4 y MLPE66J6 pertenecientes a Jalisco, así como los aislados MLPE52C1 y MLPE54C1 provenientes de Colima. El grupo de aislados con virulencia media baja fueron MLPE22J1, MLPE64J6, procedentes de Jalisco y MLPE01M1 proveniente de Michoacán. Los aislados con virulencia baja pertenecen a Jalisco: MLPE65J6, MLPE55J5, MLPE61J2, MLPE56J5 y con el menor grado de virulencia de todos los aislados MLPE09J1 (Figura 20).

**Crecimiento longitudinal de *Pestalotiopsis* spp. en tallos de arándano variedad Biloxi**

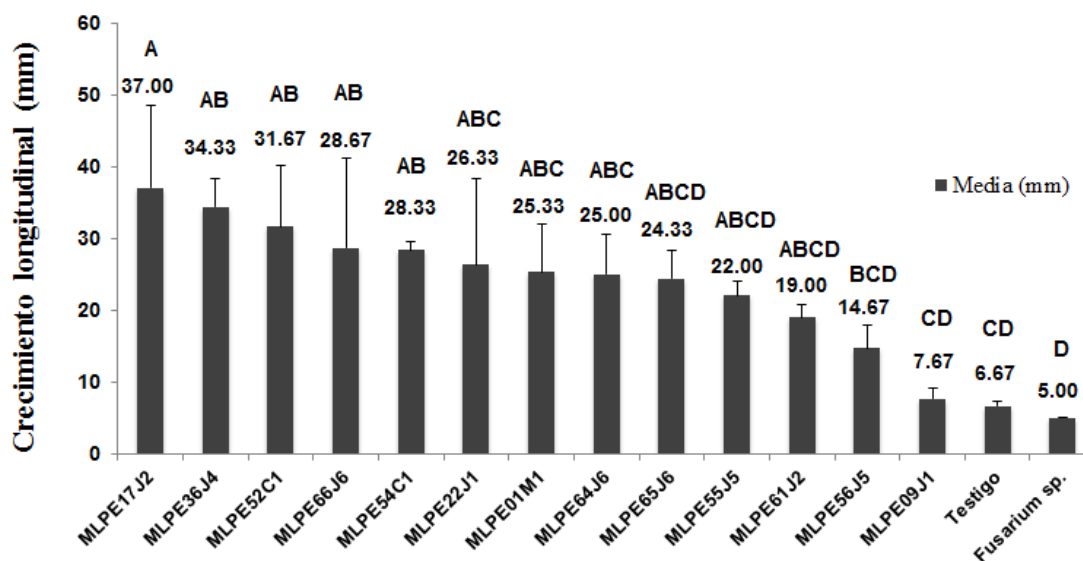


Figura 20. Análisis estadístico de las pruebas de patogenicidad a los 5 d después de la inoculación, realizadas en tallos de arándano variedad Biloxi con 13 aislados de *Pestalotiopsis* spp. provenientes de Jalisco (J1 a J6), Michoacán (M1) y Colima (C1). Además de un testigo negativo: *Fusarium* sp. y un testigo absoluto. La línea sobre la barra indica la desviación estándar.

Los aislados de *Pestalotiopsis* spp. que fueron inoculados en tallos de arándano variedad Biloxi comenzaron a necrosar el tejido a las 24 h después de la inoculación, mientras que en el día 5 después de haber sido inoculados presentaron lesiones necróticas de 7.67 a 37.00 mm y presencia de algunos acérvulos. Estas lesiones fueron muy similares a las que se observan en plantaciones comerciales, sin embargo este crecimiento rápido del hongo difiere con lo reportado por Espinoza *et al.* (2008), ya que ellos llevaron a cabo la inoculación de tallos desprendidos y reportan lesiones de 10.30 a 17.00 mm después de 25 d de la inoculación. En el presente estudio se inocularon tallos de plantas variedad Biloxi y en el trabajo de Espinoza *et al.* (2008) se utilizaron tallos de plantas variedad O’Neal, lo anterior podría deberse a la susceptibilidad de algunas variedades hacia distintos patógenos (Prodorutti *et al.*, 2007; Smith, 2009). El avance acelerado del hongo también podría estar relacionado con la

edad de la planta, ya que los tallos variedad Biloxi tenían un año de edad y los de O'Neal dos años (Polashock y Kramer, 2006). Lo anterior es importante, ya que podría indicar un comportamiento similar de *Pestalotiopsis* spp. en campo, cuando el hongo encuentra las condiciones de humedad y temperatura crece aceleradamente, con una probabilidad muy alta de infectar a la planta en un corto periodo de tiempo.

Como resultado del reaislamiento del hongo que causó las lesiones en los tallos de arándano, se obtuvieron colonias de *Pestalotiopsis* spp. de los 13 tratamientos, cuyas características macroscópicas como micelio blanco, algodonoso y presencia de acérvulos; así como microscópicas: conidios de cinco células, tres versicólicas en el centro y dos hialinas en los extremos; tres ornamentaciones apicales y una basal corresponden con las reportadas por Maharachchikumbura *et al.* (2011).

Las pruebas de patogenicidad deben realizarse en plantas de arándano para confirmar los resultados obtenidos en las pruebas de patogenicidad *in vitro*, realizadas en tallos desprendidos, ya que algunos aislados podrían presentar un comportamiento distinto si son expuestos a cambios de temperatura y humedad (Espinoza *et al.*, 2008).

La primera estrategia de control de la enfermedad podría ser la realización de pruebas de eficacia biológica con diferentes fungicidas tanto *in vitro* (con los aislados obtenidos en este estudio) como *in situ*, ya que la incidencia y severidad de la enfermedad tiende a incrementarse (Virgen, 2017).

## 7.6. Caracterización molecular

Con el ADN de los 34 aislados fúngicos y 8 diferentes pares de oligonucleótidos se obtuvo un total de 135 bandas mediante PCR, de las cuales 110 fueron polimórficas. Lo que resulta en un polimorfismo de 81.5%. La longitud de los fragmentos obtenidos con los oligonucleótidos utilizados fue de 200 a 4000 pb. Este resultado demuestra que los marcadores ISSR son adecuados para este tipo de estudios de variabilidad genética de *Pestalotiopsis* spp. (Bayraktar *et al.*, 2008) (Figuras 21 y 22) (Cuadro 8).

El nivel de polimorfismo obtenido fue de 81.5% mediante ISSR, lo cual difiere a lo reportado por Joshi *et al.* (2009), ya que ellos obtuvieron un 100% de polimorfismo en aislados de *Pestalotiopsis* spp. analizados mediante ISSR. Lo anterior podría deberse a que las características morfológicas de los aislados eran muy diversas y correspondían a varias especies, mientras que en el presente análisis no existió gran variabilidad morfológica, por lo que el nivel de polimorfismo esperado era menor.

El alto nivel de polimorfismo obtenido mediante la caracterización molecular, posiblemente está relacionado con la reciente introducción del cultivo a estas zonas del occidente de México, ya que *Pestalotiopsis* spp. se ha reportado en frutales como mango (Ko *et al.*, 2007), guayaba (Keith *et al.*, 2006), aguacate (Valencia *et al.*, 2011) e incluso como endófito en diversas especies vegetales (Hu *et al.*, 2007; Espinoza *et al.*, 2008). Este hongo parece estar adaptándose a infectar plantas de arándano, lo cual coincide con el estudio de Jeewon *et al.* (2004) donde reportan que algunos aislados de *Pestalotiopsis* spp. no presentan especificidad de hospedero.



**Cuadro 8. Características de los fragmentos ISSR amplificados a partir de 34 aislados de *Pestalotiopsis* spp. procedentes de Jalisco, Colima y Michoacán: rango de amplificación, número de bandas producidas, número de bandas polimórficas y porcentaje de bandas polimórficas.**

Nombre del Oligonucleótido	Secuencia del Oligonucleótido (5'→3')	Rango de amplificación (pb)	Bandas producidas	Bandas polimórficas	Porcentaje de bandas polimórficas
OL1	TGC(AC) <sub>6</sub>	500-3000	10	7	70.0
OL2	(AG) <sub>8</sub> C	450-2000	12	10	83.3
OL3	(GA) <sub>8</sub> YG	400-2500	17	14	82.4
OL4	DBD(AC) <sub>7</sub> A	300-3000	20	15	75.0
OL5	(GA) <sub>8</sub> YC	400-3000	16	13	81.3
OL6	C(AC) <sub>7</sub> AG	300-3500	21	17	81.0
OL7	HVHT(GT) <sub>7</sub>	200-4000	22	19	86.4
OL8	VHV(GT) <sub>7</sub> G	200-3000	17	15	88.2
<b>Total</b>			<b>135</b>	<b>110</b>	<b>81.5</b>

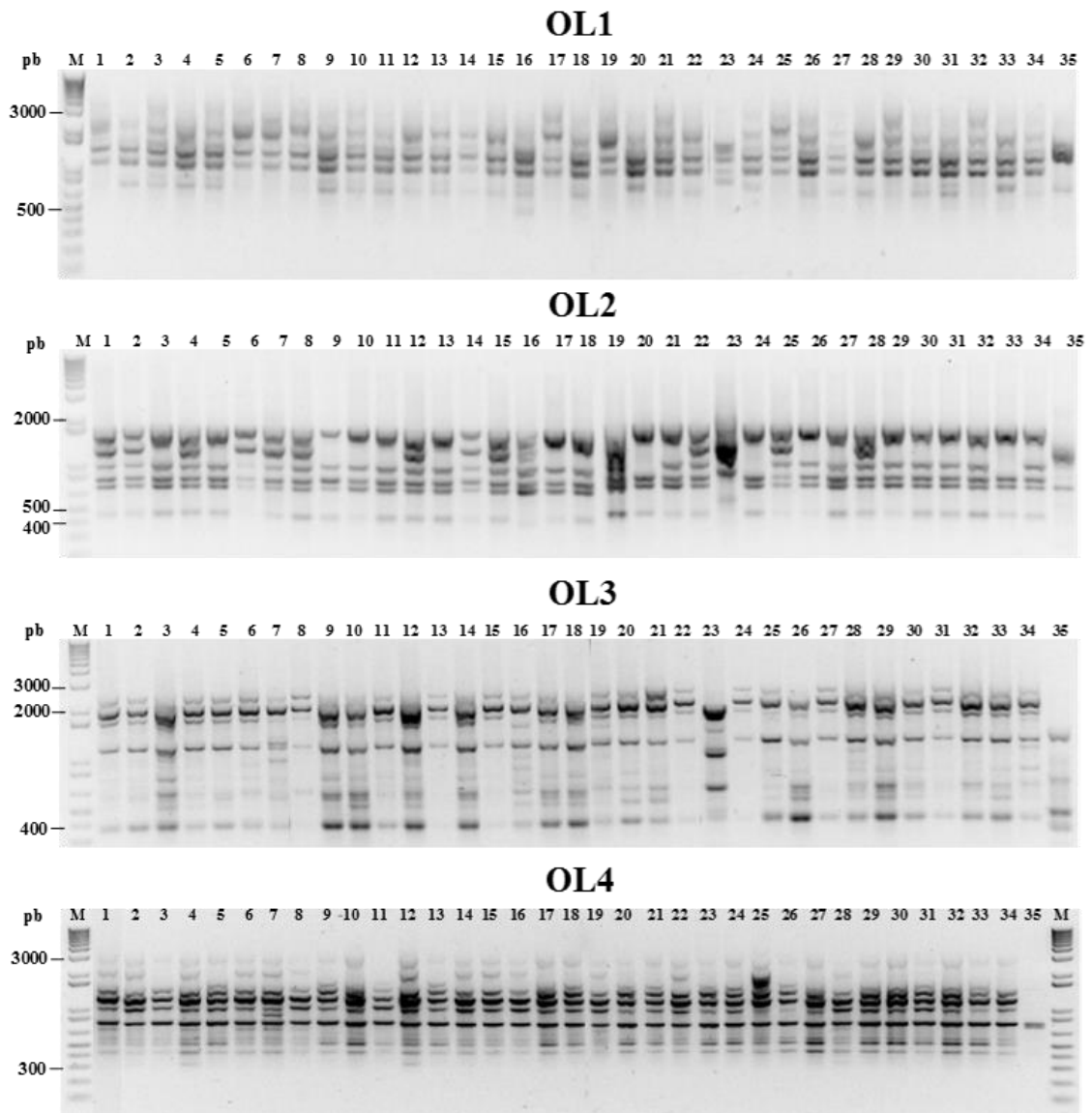


Figura 21. Patrón de amplificación en geles de agarosa al 1.1% con los oligonucleótidos ISSR OL1 a OL4. M: marcador de tamaño molecular. Carriles 1 al 25: aislados de *Pestalotiopsis* spp. provenientes de Jalisco. Carriles 26 al 32: aislados de *Pestalotiopsis* spp. procedentes de Michoacán. Carriles 33 y 34: aislados de *Pestalotiopsis* spp. provenientes de Colima. Carril 35: *Macrophomina phaseolina*, control negativo.

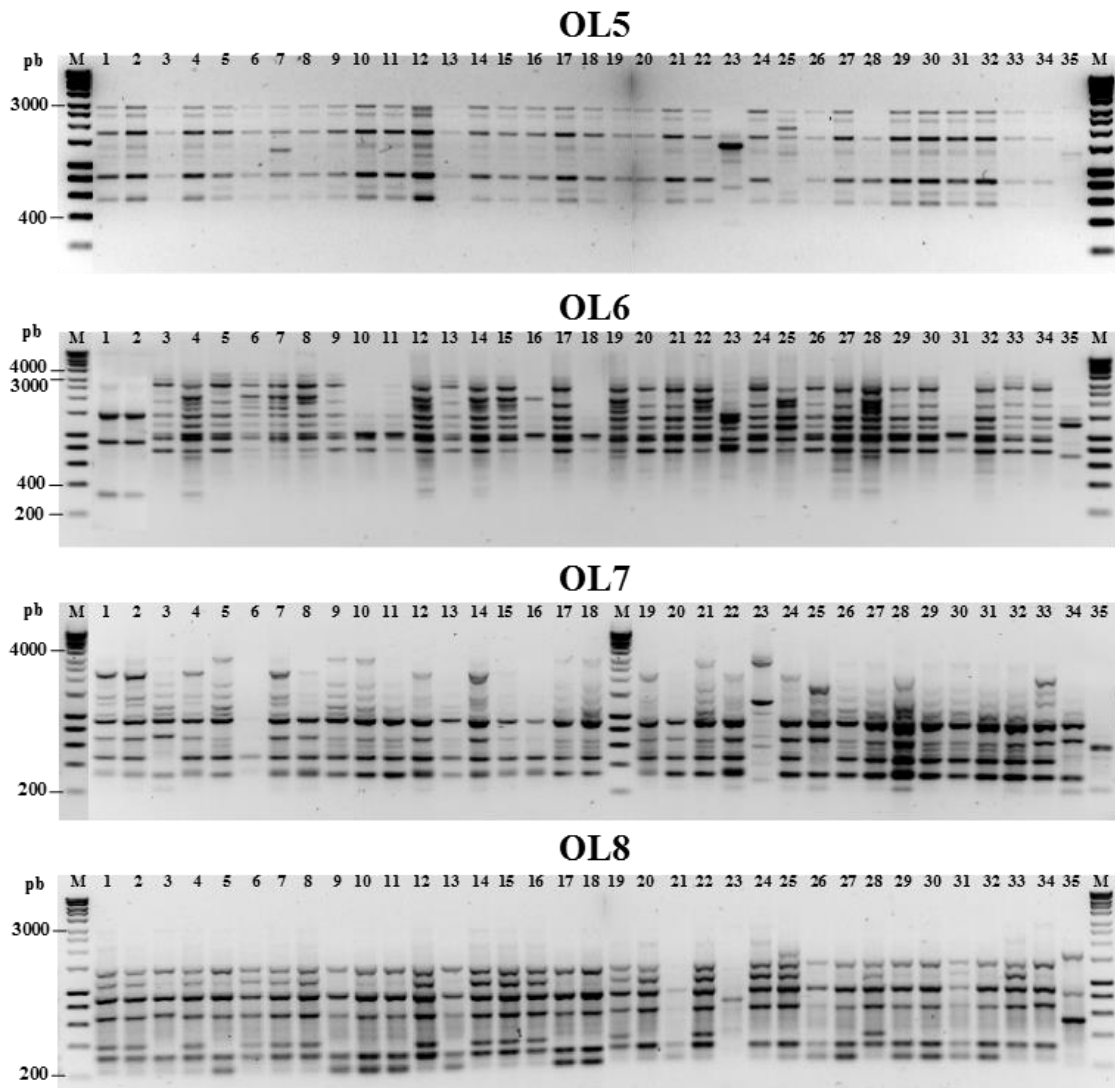


Figura 22. Patrón de amplificación en geles de agarosa al 1.1% con los oligonucleótidos ISSR OL5 a OL8. M: marcador de tamaño molecular. Carriles 1 al 25: aislados de *Pestalotiopsis* spp. provenientes de Jalisco. Carriles 26 al 32: aislados de *Pestalotiopsis* spp. procedentes de Michoacán. Carriles 33 y 34: aislados de *Pestalotiopsis* spp. provenientes de Colima. Carril 35: *Macrophomina phaseolina*, control negativo.

Para determinar la similitud entre los aislados, mediante el coeficiente de Jaccard, se obtuvo un valor menor de 0.34 para el aislado MLPEA07J5 (grupo I) y un valor mayor de 0.85 para los aislados MLPE47C1 y MLPE54C1 (grupo III). Mediante el agrupamiento por el método UPGMA se obtuvieron 4 grupos. El grupo I corresponde a MLPEA07J5, mientras que el grupo II corresponde a MLPEA20J5. En el caso del grupo III presenta aislados de los 3 estados y el grupo IV está formado por individuos de Jalisco y Colima (Figura 23). El coeficiente de correlación cofenética fue de 0.91, lo cual indica que se utilizó el método adecuado para agrupar los datos, es decir, existe una mínima distorsión introducida durante el agrupamiento (Sokal y Rohlf, 1962; Mir *et al.*, 2013).

La formación de cuatro grupos podría indicar que existe más de una especie de *Pestalotiopsis* implicada en este estudio. Sin embargo, datos obtenidos de la caracterización morfológica microscópica, indican que se trata de una sola especie, pero debido a la falta de conidios suficientes para la caracterización de ocho aislados (MLPE43J4, MLPEA07J5, MLPEA18J5, MLPEA20J5, MLPEA51J5, MLPE452C1, MLPE453C1, MLPE54C1) no se logró completar dicha caracterización, solo se observaron conidios de cinco células con tres células centrales pigmentadas. Los aislados de los grupos I (MLPEA07J5) y II (MLPEA20J5) podrían pertenecer a *P. neglecta*, ya que son diferentes al resto de aislados y Espinoza *et al.* (2008) reportan la asociación de esta especie con el cáncer de tallo de arándano.

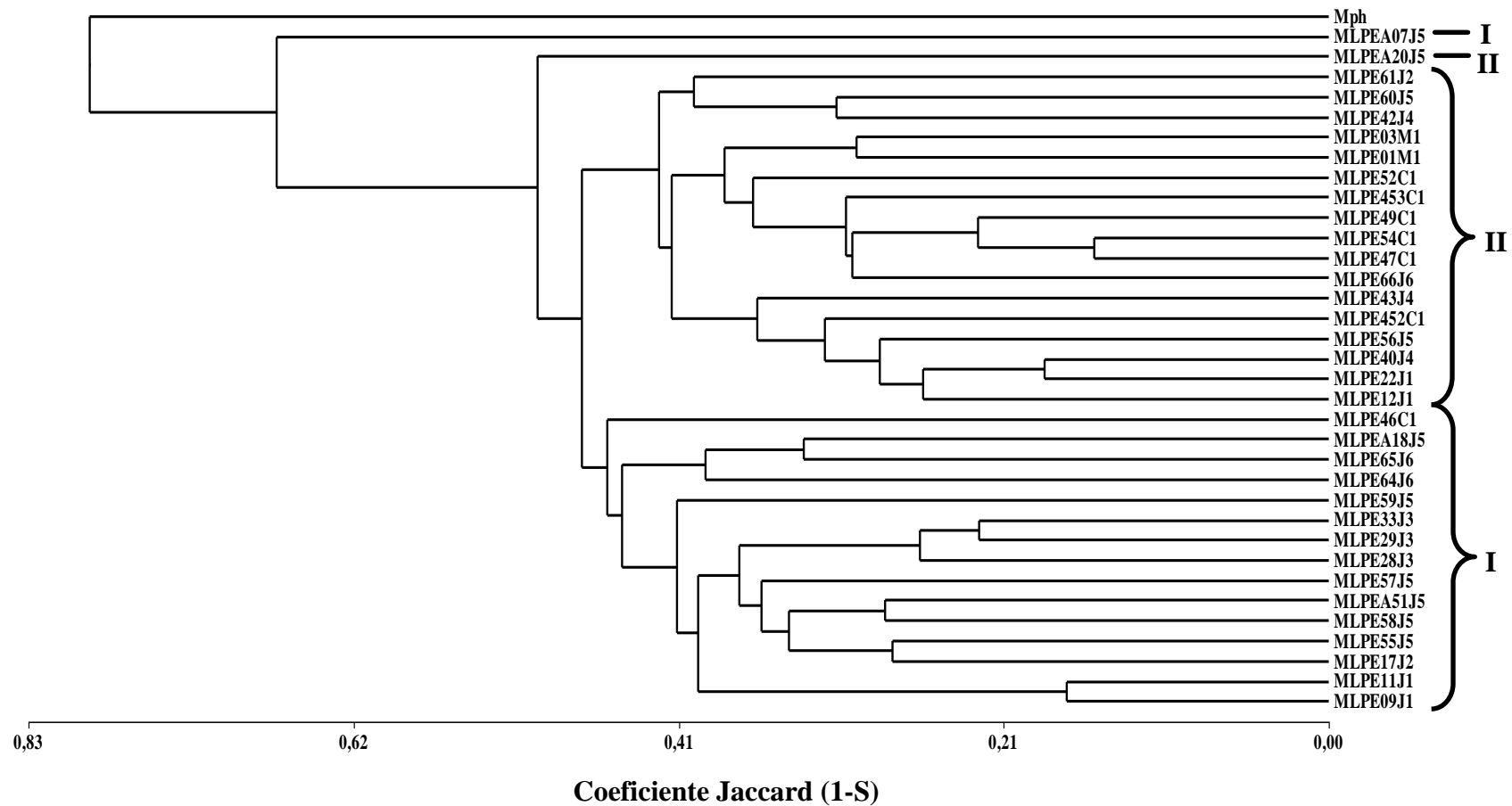


Figura 23. Dendrograma obtenido por el método de agrupamiento UPGMA para los 34 aislados de *Pestalotiopsis* spp. provenientes de Jalisco (J1 a J6), Colima (C1) y Michoacán (M1), como método de distancia se empleó el coeficiente de similitud de Jaccard (Mattioni *et al.*, 2002). Mph: *Macrophomina phaseolina*, control negativo.

Los grupos formados de acuerdo a la caracterización molecular no corresponden a los grupos resultantes de la caracterización morfológica ni patogénica (Joshi *et al.*, 2009), lo anterior podría estar relacionado a la reciente introducción del cultivo en la mayoría de las zonas muestreadas, lo cual provoca un movimiento constante de plantas dentro de los tres estados del occidente de México e incluso de otros estados productores de arándano, ya que la demanda de nuevas plantaciones se incrementó en los últimos cinco años (SIAP, 2017). Debido a este incremento de la superficie cultivada de arándano, es necesario ampliar el estudio de la incidencia y severidad de la enfermedad, así como la caracterización morfológica, patogénica y molecular del agente etiológico para desarrollar estrategias adecuadas de prevención, diagnóstico y control del cáncer de tallo de arándano (Virgen, 2017).

## 8. CONCLUSIONES

Existe poca variabilidad morfológica entre los aislados de *Pestalotiopsis*, lo que sugiere que es una sola especie, de acuerdo a su caracterización: *Pestalotiopsis clavispora*.

Las variables morfológicas que mayor información aportan son la longitud de las ornamentaciones apicales, longitud y ancho del conidio, número de ornamentaciones apicales y la longitud de la ornamentación basal.

*Pestalotiopsis clavispora* está asociado al cáncer de tallo en arándano, de acuerdo a las pruebas de patogenicidad *in vitro*.

El alto porcentaje de polimorfismo que se detectó con los marcadores ISSR indica que son adecuados para el estudio de la variabilidad genética de *Pestalotiopsis* spp.

El análisis de agrupamiento UPGMA señala la existencia de cuatro grupos, que no tienen relación con el sitio de origen de los aislados.

El alto nivel de polimorfismo y el bajo nivel de variación morfológica entre los individuos, sugiere la necesidad de ampliar el análisis incluyendo más individuos de las tres poblaciones para tratar de establecer con mayor certeza la variabilidad genética de *Pestalotiopsis* spp.

## 9. LITERATURA CITADA

- Aneberries. Asociación Nacional de Exportadores de Berries. Lista de plaguicidas autorizados 2016. [Consultado el 13 de septiembre de 2017]. Disponible en: <http://www.aneberries.mx/comision-de-inocuidad>
- Bayraktar H., Dolar F.S. y Maden S. 2008. Use of RAPD and ISSR Markers in Detection of Genetic Variation and Population Structure among *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* Isolates on Chickpea in Turkey. *Journal of Phytopathology* 156:146-154.
- Boyzo M.J., Rebollar A.A., Silva R.H.V. y Ramirez M.G. 2016. First Report of *Neofusicoccum parvum* Causing Stem Blight and Dieback of Blueberry in Mexico. *Plant Disease* 100(12):2524.
- Chen Y., Zhang A.F., Yang X., Gu C.Y., Kyaw E.P., Yi X.K. y Xu Y.L. 2016. First Report of *Pestalotiopsis clavispora* Causing Twig Blight on Highbush Blueberry (*Vaccinium corymbosum*) in Anhui Province of China. *Plant Disease* 100(4):859.
- Cisternas E. y France A. 2009. Manual de campo. Plagas, enfermedades y desórdenes fisiológicos del arándano en Chile. Chillán, Chile: Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Boletín INIA N° 189. p. 88.
- Daykin M.E. y Milholland R.D. 1990. Histopathology of blueberry twig blight caused by *Phomopsis vaccinii*. *Phytopathology* 80:736-740.
- Espinoza J.G., Briceño E.X., Keith L.M. y Latorre B.A. 2008. Canker and Twig Dieback of Blueberry caused by *Pestalotiopsis* spp. and a *Truncatella* sp. in Chile. *Plant Disease* 92:1407-1414.
- Espinoza J.G., Briceño E.X., Chávez E.R., Úrbez T.J.R. y Latorre B.A. 2009. *Neofusicoccum* spp. Associated with Stem Canker and Dieback of Blueberry in Chile. *Plant Disease* 93:1187-1194.



- Fall Creek® Farm & Nursery INC. [Consultado el 13 de septiembre de 2017]. Disponible en: <http://www.fallcreeknursery.com/commercial-fruit-growers/varieties/biloxi>
- FAO STAT. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. [Consultado el 12 de septiembre de 2017]. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/es/#compare>
- Farr D.F., Castlebury L.A. y Rossman A.Y. 2002. Morphological and molecular characterization of *Phomopsis* from blueberry and cranberry in the eastern United States. *Mycologia* 94(3):494-504.
- Ford J. 2017. Descripción de variedades de interés técnico-comercial para México. 7° Congreso Internacional Aneberries. Congreso llevado a cabo por Aneberries del 9 al 11 de agosto de 2017, Guadalajara, Jalisco, México.
- García M.X., Villamizar L.F., Torres L.A. y Cotes A.M. 2006. Efecto de subcultivos sucesivos de *Beauveria bassiana* sobre sus características y actividad contra *Premnotrypes vorax*. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología* 77:50-56.
- García R.J.C. y García G.G.L. 2010. Guía del cultivo: orientaciones para el cultivo del arándano. Asturias, España: Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario. p. 23.
- Godwin I.D., Aitken E.A.B. y Smith L.W. 1997. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. *Electrophoresis* 18:1524-1528.
- Gómez M.M.G. 2010. La poda en la productividad de arándano (*Vaccinium* spp.) en Michoacán. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Chapingo. México. p. 17.
- González P., Alaniz S., Montelongo M.J., Rauduviniče L., Rebellato J., Silvera P.E. y Mondino P. 2012. First Report of *Pestalotiopsis clavispora* Causing Dieback on Blueberry in Uruguay. *Plant Disease* 96(6):914.
- Hu H., Jeewon R., Zhou D., Zhou T. y Hyde K.D. 2007. Phylogenetic diversity of endophytic *Pestalotiopsis* species in *Pinus armandii* and *Ribes* spp.: evidence from rDNA and  $\beta$ - tubulin gene phylogenies. *Fungal Diversity* 24:1-22.

- Joshi S.D., Sanjay R., Baby U.I. y Mandal A.K.A. 2009. Molecular characterization of *Pestalotiopsis* spp. Associated with tea (*Camelia sinensis*) in southern India using RAPD and ISSR markers. *Indian Journal of Biotechnology* 8:377-383.
- Jeewon R., Liew E.C.Y. y Hyde K.D. 2002. Phylogenetic relationships of *Pestalotiopsis* and allied genera inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characters. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 25:378–392.
- Jeewon R., Liew E.C.Y., Simpson J.A., Hodgkiss I.J. y Hyde K.D. 2003. Phylogenetic significance of morphological characters in the taxonomy of *Pestalotiopsis* species. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 27:372–383.
- Jeewon R., Liew E.C.Y., y Hyde K.D. 2004. Phylogenetic evaluation of species nomenclature of *Pestalotiopsis* in relation to host association. *Fungal Diversity* 17:39-55.
- Keith L.M., Velasquez M.E. y Zee F.T. 2006. Identification and Characterization of *Pestalotiopsis* spp. Causing Scab Disease of Guava, *Psidium guajava*, in Hawaii. *Plant Disease* 90:16-23.
- Ko Y., Yao K.S., Chen C.Y. y Lin C.H. 2007. First Report of Gray Leaf Spot of Mango (*Mangifera indica*) Caused by *Pestalotiopsis mangiferae* in Taiwan. *Plant Disease* 91(12):1684.
- Latorre B.A., Elfar K., Torres R. y Díaz G.A. 2013. Characterization of *Diaporthe australafricana* and *Diaporthe* spp. Associated with Stem Canker of Blueberry in Chile. *Plant Disease* 97(8):1042-1050.
- Lim T.K. 2012. *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants, Volume 2, Fruits*. Dordrecht, New York. Springer Netherlands. p. 452-464.
- Liu A.R., Xu T. y Guo L.D. 2007. Molecular and morphological description of *Pestalotiopsis hainanensis* sp. nov., a new endophyte from a tropical region of China. *Fungal Diversity* 24:23-36.
- Liu A.R., Chen S.C., Wu S.Y., Xu T., Guo L.D., Jeewon R. y Wei J.G. 2010. Cultural studies coupled with DNA based sequence analyses and its implication on

- pigmentation as a phylogenetic marker in *Pestalotiopsis* taxonomy. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 57:528–535.
- Maharachchikumbura S.S.N., Guo L.D., Chukeatirote E., Bahkali A.H. y Hyde K.D. 2011. *Pestalotiopsis*—morphology, phylogeny, biochemistry and diversity. *Fungal Diversity* 50:167–187.
- Maharachchikumbura S.S.N., Guo L.D., Cai L., Chukeatirote E., Wu W.P., Sun X., Crous P.W., Bhat D.J., McKenzie E.H.C., Bahkali A.H. y Hyde K.D. 2012. A multi-locus backbone tree for *Pestalotiopsis*, with a polyphasic characterization of 14 new species. *Fungal Diversity* 56:95–129.
- Maharachchikumbura S.S.N., Guo L.D., Chukeatirote E. y Hyde K.D. 2014a. Improving the backbone tree for the genus *Pestalotiopsis*; addition of *P. steyaertii* and *P. magna* sp. nov. *Mycological Progress* 13:617–624.
- Maharachchikumbura S.S.N., Hyde K.D., Groenewald J.Z., Xu J. y Crous P.W. 2014b. *Pestalotiopsis* revisited. *Studies in Mycology* 79:121-186.
- Michigan State University. 2017. [Consultado el 6 de septiembre de 2017] Disponible en: [http://msue.anr.msu.edu/topic/blueberries/pest\\_management/diseases](http://msue.anr.msu.edu/topic/blueberries/pest_management/diseases)
- Mattioni C., Casasoli M., Gonzalez M., Ipinza R. y Villani F. 2002. Comparison of ISSR and RAPD markers to characterize three Chilean *Nothofagus* species. *Theoretical and Applied Genetics* 104:1064–1070.
- Milholland R.D. y Galletta G.J. 1969. Pathogenic variation among isolates of *Botryosphaeria corticis* on blueberry. *Phytopathology* 59:1540-1543.
- Milholland R.D. 1970. Histology of *Botryosphaeria* canker of susceptible and resistant highbush blueberries. *Phytopathology* 60:70-74.
- Mir A., Rosselló F. y Rotger L. 2013. A new balance index for phylogenetic trees. *Mathematical Biosciences* 241:125–136.
- Mondragón F.A., López M.J., Ochoa A.S. y Gutiérrez C.M. 2012. Hongos Asociados a la Parte Aérea del Arándano en Los Reyes, Michoacán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 30(2):141-144.

- Polashock J.J. y Kramer M. 2006. Resistance of Blueberry cultivars to *Botryosphaeria* stem blight and *Phomopsis* Twig blight. HortScience 41(6):1457-1461.
- Pritts M.P. y Hancock J.F. 1992. Highbush Blueberry Production Guide. Ithaca, New York. NRAES Ed. p 87-93.
- Prodorutti D., Pertot I., Giongo L. y Gessler C. 2007. Highbush blueberry: Cultivation, Protection, Breeding and Biotechnology. The European Journal of plant Science and Biotechnology 1(1):44-56.
- Ratnaparkhe M.B. 2007. Blueberry chapter 10. Genome Mapping and Molecular Breeding in plants, volume 4, Fruits and Nuts. Berlin-Heidelberg, Germany. C. Kole (Ed). Springer. p. 217-219.
- Reddy M.P., Sarla N. y Siddiq E.A. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. Euphytica 128:9-17.
- Retamales J.B. y Hancock J.F. 2012. Blueberries. Wallingford, Reino Unido. CABI Publishing. p. 5.
- Sammonds J., Billones R., Rocchetti M., Ridgway H.J., Walter M. y Jaspers M.V. 2009. Survey of blueberry farms for *Botryosphaeria* dieback and crown rot pathogens. New Zealand Plant Protection 62:238-242.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) [Consultado el 14 de mayo 2017] Disponible en: <https://www.gob.mx/sagarpa>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) [Consultado el 15 de mayo de 2017] Disponible en: <https://www.gob.mx/siap/>
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). 2012. Manual técnico de muestreo de productos agrícolas para la determinación de residuos plaguicidas. [Consultado el 13 de mayo de 2017] Disponible en: <https://www.gob.mx/senasica>
- Smith B.J. 2009. Stem Blight of Southern Blueberries: Cultivar Susceptibility and Effect of Chemical Treatments. Acta Horticulturae 810:385-394.

- Sokal, R.R. y Rohlf F.J. 1962. The Description of Taxonomic Relationships by Factor Analysis. *Taxon* 11:33-40.
- Steyaert R.L. 1949. Contributions à l'étude monographique de *Pestalotia* de Not. et *Monochaetia* Sacc. (*Truncatella* gen. nov. et *Pestalotiopsis* gen. nov.). Bulletin Jardin Botanique Etat Bruxelles 19:285–354.
- Steyaert R.L. 1953. New and old species of *Pestalotiopsis*. Transactions of the British Mycological Society 36(2):81-89.
- Valencia A.L., Torres R. y Latorre B.A. 2011. First Report of *Pestalotiopsis clavispora* and *Pestalotiopsis* spp. Causing Postharvest Stem End Rot of Avocado in Chile. *Plant Disease* 95(4):492.
- Virgen C.G. 2017. Hongos asociados a arándano. 7º Congreso Internacional Aneberries. Congreso llevado a cabo por Aneberries del 9 al 11 de agosto de 2017, Guadalajara, Jalisco, México.
- Wang B.C., He R. y Li Z.M. 2010. Antioxidant Activity of Blueberry Anthocyanins. *Food Technology and Biotechnology* 48(1):42–49.
- Weingartner D.P. 1969. Studies of canker and stem blight diseases of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) in Michigan. Tesis Doctoral. Michigan State University, EUA. p. 3-5.
- Weingartner D.P. y Klos E.J. 1974. Etiology and Symptomatology of Canker and Dieback Diseases on Highbush Blueberries Caused by *Godronia* (*Fusicoccum*) *cassandrae* and *Diaporthe* (*Phomopsis*) *vaccini*. *Phytopathology* 65:105-110.
- Zietkiewicz E., Rafalski A. y Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20:176–183.