

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA



Biodiversidad de Patógenos en Jitomate en Tamaulipas

Por:

ANTONIO OROZCO PLANCARTE

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Saltillo, Coahuila, México

Marzo de 2015

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

Biodiversidad de Patógenos en Jitomate en Tamaulipas

Por:

ANTONIO OROZCO PLANCARTE

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener título de

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Aprobada



DRA. YISA MARÍA OCHOA FUENTES
ASESOR PRINCIPAL



DR. ERNESTO CERNA CHÁVEZ
COASESOR



MC OTILIO VÁZQUEZ MARTÍNEZ
COASESOR



DR. LEOBARDO BAÑUELOS HERRERA
COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE AGRONOMÍA


Coordinación
División de Agronomía
Saltillo, Coahuila, México

Marzo de 2015

AGRADECIMIENTOS

Doy gracias a Dios, por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente con pensamientos positivos, por haber puesto en mi camino a aquellas personas que me han brindado su apoyo y compañía durante toda mi estancia profesional.

A mi **ALMA MATER** por darme los conocimientos necesarios para enfrentar la vida y albergarme durante estos años de licenciatura siempre te recordare.

A la **DRA. YISA MARÍA OCHOA FUENTES** por todo el apoyo que me ha brindado, por sus consejos para ser una mejor persona profesional, además de todos los conocimientos, amistad y palabras de aliento que en los momentos difíciles y me han servido para buscar nuevas alternativas, solucionar problemas y sobre todo para ser una mejor persona ética y profesional, además de sus asesoramientos y facilidades prestadas para la realización de la presente tesis. Así también por depositar su confianza y comprensión en mí para la realización de este proyecto. **Muchas gracias...**

Al **DR. ERNESTO CERNA CHÁVEZ** primero que nada por la amistad que me brindo durante todo este tiempo, por la confianza que ha depositado en mí para participar en sus proyectos de investigación, inculcándome nuevos retos y conocimientos para ser un buen profesional, gracias por la ayuda incondicional en todo momento, por sus conocimientos brindados, las asesorías que me dio en materias y detalles, por ser un gran maestro y un gran amigo. **Muchas gracias...**

Al **DR. OTILIO VÁZQUEZ MARTÍNEZ** por el apoyo, comprensión y confianza durante el desarrollo de este proyecto.

Al **DR. ALBERTO MARGARITO GARCÍA MUNGÍA** por todo el apoyo incondicional durante el desarrollo del proyecto.

Al Programa de Mejoramiento del Profesorado (**PROMEP**), por brindarme la oportunidad de participar en este proyecto, así mismo le agradezco por el apoyo brindado a través de la Beca de Tesis.

A todos los **Maestros** de la Universidad que me brindaron sus conocimientos a través de las clases, en especial a los del departamento de **Parasitología Agrícola** que siempre me apoyaron dándome los conocimientos que me formaron como profesionista. **Gracias Maestros.....**

DEDICATORIAS

A mis padres:

Antonio Orozco Crescencio y Angélica Plancarte Estrada

Cuando se trata de agradecer el amor, los valores, el impulso, la motivación, el cuidado, la protección, los desvelos, y el sacrificio que han tenido para mí, las palabras no alcanzan para agradecerles por lo que han hecho de mí, nudo que me atraviesa la garganta me impide hablar, solo siento una gran emoción y un profundo agradecimiento de tenerlos a ustedes como padres, no hay manera... Ni una sola palabra que pueda expresar el infinito agradecimiento que tengo hacía ustedes por todo el apoyo que me han regalado.

En este momento los recuerdos invaden mi mente donde cada cavidad se encuentra llena de esos bonitos recuerdos que pasamos juntos desde mi niñez, quiero decirles que cada regaño, impulso, dedicación y una serie de valores que me inculcaron me han servido para lograr lo que una vez soñé y que a hora ese sueño se ha convertido en realidad, lo cual me enorgullece como hijo tener como padres a unos maravillosos seres humanos, no me canso de agradecerles por ayudarme a alcanzar mis metas y por la confianza, cariño y amor que me brindan día a día....Con la preparación que he obtenido a lo largo de mi carrera profesional que hoy finaliza, el día de mañana les recompensaré el esfuerzo el amor y el sacrificio que me han brindado.

Su hijo que los quiere...

“DIOS LOS BENDIGA SIEMPRE”.

A mis Abuelitos:

Aurelia Crescencio Gante y Vicente Orozco Montoya (†)

Por todo el cariño, amor, confianza, que me han brindado, en especial quiero agradecerte a ti Mamá Carmen; te llamo así porque fue el único nombre que me enseñaste a decirte desde niño, muchas gracias por todo el amor que me has regalado, por todas esas palabras llenas de sabiduría que me han llevado por el buen camino, por la educación y los valores que me inculcaste desde niño, gracias por estar conmigo siempre en todo momento. **Te quiero mucho...**

A mi esposa Orlanda Antonio del Ángel

Por ser una gran amiga, compañera, por apoyarme en los momentos de alegría, en los momentos difíciles y tristes que la vida me ha puesto a prueba, pero sobre todo por darme la dicha de ser padre de dos hermosas niñas, gracias por alegrarme los días.

A mis hijas: Yoletzy Orozco Antonio y Andrea Orozco Antonio

Por ser la mayor motivación, mi razón de vivir, de seguir luchando día a día para darles una vida mejor, gracias por enseñarme a ser padre, por darme la experiencia de verlas crecer, gracias por enseñarme a ver la vida diferente, enfrentarme a nuevos retos buscando siempre su bienestar y felicidad. **Las Amo....**

Y a toda mi familia:

Por todo su apoyo que me han brindado siempre, y me han guiado por el camino del bien, por todos los consejos, momentos de felicidad, pero sobre todo por formar parte de mi vida.

Con amor y cariño...

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIAS	iv
ÍNDICE GENERAL	vi
ÍNDICE DE CUADROS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
RESUMEN	xi

I.- INTRODUCCIÓN.....	1
1.2.- Objetivo general.....	2
1.3.- Objetivo específico.....	2
1.4.- Hipótesis.....	2
II.- REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1.- Origen del tomate	3
2.2.- Clasificación taxonómica	4
2.3.- Descripción botánica	4
2.4.- Valor nutricional	5
2.5.- Importancia económica del tomate	6
2.6.- Importancia social del tomate.....	6
2.7.- Variedades.....	7
2.8.- Producción mundial de tomate.....	7
2.9.- Producción nacional de Tomate	8
2.10.- Principales plagas presentes en el tomate	9
2.10.1.- Tizón temprano (<i>Alternaria solani</i>).....	10
2.10.1.1.- Ciclo biológico y epidemiología.....	11
2.10.1.2.- Síntomas y daños	11
2.10.2.- Cenicilla (<i>Leveillula taurica</i>).....	12
2.10.2.1.- Distribución	12
2.10.2.2.- Hospederos.....	13
2.10.2.3.- Organismo causal	13
2.10.2.4.- Sintomatología.....	13
2.10.2.5.- Ciclo biológico.....	14
2.10.2.6.- Epidemiología	15
2.10.3.- Verticilosis (<i>Verticillium dahliae</i>).....	15

2.10.3.1.- Hospederos.....	15
2.10.3.2.- Sintomatología.....	16
2.10.3.3.- Ciclo biológico.....	16
2.11.- Pruebas moleculares.	17
III.- MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1.- Etapa experimental 1: Obtención de los patógenos a partir de muestras de hojas de tomate en Papa Dextrosa Agar.....	21
3.1.1.- Material vegetal.....	21
3.1.2.- Desinfección de las hojas de tomate	21
3.1.3.- Siembra de las muestras de hojas de tomate	22
3.2.- Etapa experimental 2: Aislamiento de los patógenos.....	22
3.2.1.- Incremento del inóculo por siembra directa.....	22
3.2.2.- Aislamiento por punta de hifa.....	22
3.3.- Etapa experimental 3: Identificación de las especies de hongos por morfología presentes en las muestras de hojas de tomate	23
3.4.- Etapa experimental 4: Identificación molecular por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	23
3.4.1.- Extracción del Acido Desoxirribonucleico (ADN)	24
3.4.2.- Electroforesis	24
3.4.3.- Preparación del Gel de Agarosa.....	25
3.4.4.- Espectrofotometría.....	25
3.4.5.- Cálculos de ADN	26
3.4.6.- Preparación del coctel de PCR.....	26
3.4.7.- Electroforesis	28
3.4.8.- Preparación del Gel de Agarosa.....	28
3.4.9.- Purificación de bandas amplificadas del gel de Agarosa producto de PCR.....	29
3.4.10.- Secuenciación de las muestras de ADN producto de la PCR	30
IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
4.1.- Etapa experimental 1: Obtención de los patógenos a partir de muestras de hojas de tomate en Papa Dextrosa Agar.....	31
4.1.1.- Siembra de las muestras de hojas de tomate	31
4.2.- Etapa experimental 2: Aislamiento de los patógenos.....	33
4.2.1.- Incremento del inóculo por siembra directa.....	33
4.2.2.- Aislamiento por punta de hifa.....	34
4.3.- Etapa experimental 3: Identificación de las especies de hongos presentes en las muestras de hojas de Tomate	35

4.4.- Etapa experimental 4: Identificación molecular por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	38
4.4.1.- Espectrofotometría.....	39
4.4.2.- Amplificación de ADN.....	40
4.4.3.- Secuenciación de las muestras de ADN producto de la PCR	41
V.- CONCLUSIÓN	42
VI.- LITERATURA CITADA	43
VII.- APÉNDICE.....	48
<i>Verticillium dahliae</i>	48
<i>Alternaria solani</i>	48

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Valor nutricional del tomate por cada 100 gr de peso. Fuente (Argerich, 2002).....	5
Cuadro 2. Producción Agrícola, Ciclo: Cíclicos y Perennes 2012, Modalidad: Riego + Temporal de Tomate rojo (jitomate) Fuente SIAP 2012.....	8
Cuadro 3. Reactivos y cantidades a utilizar para cargar el gel de Agarosa.	25
Cuadro 4. Componentes y cantidades a utilizar para la preparación del coctel de PCR.	27
Cuadro 5. Programa para Taq-GO (Taq DNA Polymerase), en el Termociclador.	28
Cuadro 6. Reactivos y cantidades a utilizar para cargar el gel de Agarosa para PCR.	29
Cuadro 7. Concentración de ADN, medidos en un espectrofotómetro.....	39
Cuadro 8. Comparación molecular por alineamiento de las secuencias reportadas en el banco de genes con las secuencias intergénicas (ITS) ¹ de los genes rDNA de las especies de hongos aisladas de hojas de tomate.....	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diferentes crecimientos y coloraciones en las muestras (imagen A y B). ...	32
Figura 2. Diferentes coloraciones en los tres tipos lesiones (ápice (C1 y D2), borde (E1 y F2) y en las partes céntricas (G1 y H2) de la hoja de tomate).....	32
Figura 3. Cepas de los patógenos aislados en los tres tipos lesiones (ápice (I1 y I2), borde (J1 y J2) y en las partes céntricas (K1 y K2) de la hoja de tomate teniendo en cuenta que 1 (Juan Pablo1) y 2 (Juan Pablo 2).	34
Figura 4. Protocolo para purificación de patógenos por punta de hifa	35
Figura 5. Morfología de aislamiento de <i>Alternaria spp.</i> , de hojas de tomate en Lactofenol azul; imagen L (conidio septado), imagen M (conidióforo) e imagen N (cadena de conidios).....	36
Figura 6. Morfología de aislamiento de <i>Alternaria spp.</i> , en los tres tipos lesiones (ápice (O1 y O2), borde (P1 y P2) y en las partes céntricas (Q1 y Q2) de la hoja de tomate teniendo en cuenta que 1 (Juan Pablo1) y 2 (Juan Pablo 2).....	37
Figura 7. Morfología de aislamiento de <i>Verticillium spp.</i> , en la lesión de Ápice de la hoja de tomate variedad (Juan Pablo) encontrándose únicamente en la muestra 2..	38
Figura 8. Presencia de bandas de AND, producto de la extracción.....	39
Figura 9. Presencia de bandas amplificadas de ADN, producto de la PCR.....	40

RESUMEN

El tomate es la hortaliza de mayor consumo en el mundo, forma parte importante en la dieta alimenticia de la personas, la producción de tomate en México ocupa el primer lugar dentro de las especies hortícolas, por superficie cultivada y cosechada, además de las ganancias que se generan de este cultivo, por esta razón es importante conocer las principales enfermedades que atacan al cultivo así como también las pérdidas económicas que dichas enfermedades generan. Dentro de las enfermedades principales que atacan al cultivo son pudriciones de la raíz y ahogamiento (*Pythium sp.* y *Rhizoctonia solani*), pudriciones del cuello y raíz (*Phytophthora capsici*), tizón tardío (*Phytophthora infestans*), tizón temprano (*Alternaria solani*), cenicilla (*Leveillula taurica*), moho de la hoja (*Cladosporium fulvum*), mancha gris (*Stemphyllium solani*), marchitez (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*), pudrición de la corona y raíz (*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*), Moho blanco o pudrición blanca (*Sclerotinia sclerotiorum*) y moho gris (*Botrytis cinérea*). (Mendoza, 1996).

Actualmente gracias a los avances científicos y tecnológicos, el identificar organismos patógenos ha resultado una tarea más práctica y menos complicada, dado que el desarrollo de la biología molecular nos ha brindado herramientas fundamentales y una serie de metodologías a seguir que día a día se han ido modificando con el fin de mejorar las técnicas para la obtención de mejores resultados, por lo que la presente investigación tiene como objetivo identificar la biodiversidad de patógenos asociados al cultivo del Tomate variedad Juan Pablo, por medio de identificación morfológica e identificación molecular utilizando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Palabras clave: identificación morfológica, identificación molecular, *Pythium sp.*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici*, *Phytophthora infestans*, *Alternaria solani*, *Leveillula taurica*, *Cladosporium fulvum*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinérea*.

I.- INTRODUCCIÓN

El tomate *Solanum lycopersicon* L. (Peralta *et al.*, 2005). El origen del género *Lycopersicones* la región andina que hoy comparten Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia, y Chile; zona en la que el género muestra su mayor variación. La producción de tomate en México ocupa el primer lugar dentro de las especies hortícolas, por superficie cultivada y la cantidad de empleos que genera (Valenzuela, 2004).

Hasta Mayo del 2012 en México se sembraron 55,888.04 ha de tomate, siendo los principales estados productores: Sinaloa (18,623.05 ha), Michoacán (5,062.00 ha), Zacatecas (3,014.16 ha) Baja California (2,952.05 ha), Veracruz (2,920.25 ha), Morelos (2,256.50 ha), Nayarit (2,447.50 ha) Baja California Sur (2,232.74 ha), Jalisco (2,079.98 ha) y Tamaulipas (1,876.20 ha), (SIAP, 2012).

Las plantas de tomate se reproducen sexualmente, por lo que su propagación es por semilla, siendo la más utilizada para la producción de plántulas, por lo cual es muy susceptible al ataque de plagas y enfermedades ya que provocan grandes pérdidas económicas al cultivo (Carrillo *et al*, 2003).

Dentro de las enfermedades principales que atacan al cultivo son pudriciones de la raíz y ahogamiento (*Pythium sp.* y *Rhizoctonia solani*), pudriciones del cuello y raíz (*Phytophthora capsici*), tizón tardío (*Phytophthora infestans*), tizón temprano (*Alternaria solani*), cenicilla (*Leveillula taurica*), moho de la hoja (*Cladosporium fulvum*), mancha gris (*Stemphyllium solani*), marchitez (*Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici*), pudrición de la corona y raíz (*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*), Moho blanco o pudrición blanca (*Sclerotinia sclerotiorum*) y moho gris (*Botrytis cinerea*) (Mendoza, 1996).

A nivel mundial la presencia de hongos, en sistemas de producción de Tomate ocasionan una serie de enfermedades, que dependiendo del grado de severidad con que se presenten y en la parte de la planta en que afectan, tienen un amplio impacto en pérdidas económicas y pueden ocasionar la afectación en la inocuidad de los productos por la presencia directa de estos organismos (FAO, 2011).

1.2.- Objetivo general

La presente investigación tiene como objetivo identificar la biodiversidad de patógenos asociados al cultivo del Tomate variedad Juan Pablo.

1.3.- Objetivo específico

Aislar e identificarla diversidad de patógenos asociados al cultivo del Tomate variedad Juan Pablo, a partir de la recolección de muestras de hojas dañadas por organismos fitopatógenos, obtenidas de un invernadero en producción en Tula, Tamaulipas, México.

1.4.- Hipótesis

Dado a que los síntomas presentados en las muestras de hojas de tomate variedad Juan Pablo, en la parcela 1 y 2, se observaron síntomas de tizones en gran parte de las muestras, esperando a que sean síntomas causados por ***Alternaria spp.***, así como también se observó lesiones en los bordes de las hojas en forma de V invertida teniendo la sospecha de ***Verticillium spp.***

II.- REVISIÓN DE LITERATURA

2.1.- Origen del tomate

El origen del género *Lycopersicon* la región andina que hoy comparten Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia, y Chile; zona en la que el género muestra su mayor variación. Aunque se considera también que el antepasado más probable del jitomate es el jitomate silvestre (*Lycopersicon sculentum* var. *cerasiforme*) que crece espontáneamente en las regiones tropicales y subtropicales de América y se ha extendido a lo largo de los trópicos del Viejo Mundo. La llegada de los Españoles permitió la expansión de este producto al viejo continente, y de ahí a todo el mundo; de tal forma que hoy podemos encontrar entre los principales productores mundiales a E.U., China, Turquía, Italia e India (Moreña *et al.*, 2006).

De acuerdo con Smith (1987), existen evidencias arqueológicas que demuestran que el tomatillo, una variedad del tomate, acida y de color verde, que aún se consume en México, fue usada como alimento desde épocas prehispánicas. Esto hace pensar que el tomate también fue cultivado y usado por los indígenas mesoamericanos desde antes de la llegada de los españoles.

Es posible que después de la llegada de los españoles el tomate se cultivara y consumiera más que el tomatillo por su apariencia colorida y su mayor tiempo de vida después de ser cosechado. En todo caso, el tomate emigró a América Central por diversos medios. Los mayas utilizaron la fruta para su consumo. El mismo autor indica que este es el antepasado directo de algunos tomates modernos cultivados. Los españoles distribuyeron el tomate a lo largo de sus colonias en el Caribe, después de la conquista de Sudamérica. También lo llevaron a Filipinas y por allí entro a los otros continentes.

2.2.- Clasificación taxonómica

La ubicación más aceptada del tomate es la siguiente (Cronquist, 1984, Esquinas y Nuez, 1995, Peralta et al., 2005):

Reino: Methaphyta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Solanales

Familia: Solanaceae

Género: Solanum

Especie: lycopersicum L.

2.3.- Descripción botánica

Es una planta anual y puede ser semiperenne en regiones tropicales. Su sistema de raíces fibrosos y robusto, pudiendo llegar hasta 1.8 m. de profundidad. Los tallos son cilíndricos en plantas jóvenes y angulosos en plantas maduras; alcanzan alturas de 0.40 a 2.0 m. presentando un crecimiento simpódico. Las flores son bisexuales y se polinizan principalmente por medio del viento, sin necesidad de abejas, a menos que no haya viento p el aire este frio. La polinización ocurre cuando la temperatura en la noche es entre 13 y 24°C y la del día de 15.5 a 32°C. Si las temperaturas son más altas o más bajas, especialmente de noche, la polinización se dificulta (Lesur, 2006).

El racimo floral o inflorescencia está compuesto de varios ejes, cada uno de los cuales tiene una flor de color amarillo brillante. El cáliz y la corola están compuestos de cinco sépalos y cinco pétalos, respectivamente. La inflorescencia se forma a partir del 6° o 7° nudo, y cada 1 o 2 hojas se encuentran las flores en plantas de hábito determinado, y en las de hábito indeterminado se forman a partir del 7° o 10° nudo y cada cuatro hojas. El fruto del tomate es una baya compuesta por varios

lúculos, pudiendo constar desde dos (bilocular) hasta tres o más lóculos (multilocular); los cultivares comerciales pertenecen al tipo multilocular. El color más común del fruto es el rojo, pero existe amarillos, naranjas o verdes, siendo su diámetro comercial aproximado de 10 cm (Valadéz, 1989).

2.4.- Valor nutricional

La amplia aceptación y preferencia del tomate se debe a sus cualidades gustativas, la posibilidad de su amplio uso en estado fresco o elaborado en múltiples formas y su relativo aporte de vitaminas y minerales. Por cada 100 gr de peso fresco de tomate se encuentran los siguientes nutrientes:(Argerich, 2002).

Cuadro 1. Valor nutricional del tomate por cada 100 gr de peso. Fuente (Argerich, 2002).

Nutrientes	Cantidad
Proteínas	1%
Agua	94%
Hidratos de carbono	4%
Celulosa	0.6%
Grasas	0.4%
Calorías	19%
Vitamina A	1250 U
Vitamina B1	0.06 mg
Vitamina B2	0.08 mg
Vitamina C	0.23 mg
Vitamina E	0.03 mg
Vitamina K	0.05 mg
Vitamina PP	0.06 mg
Potasio	0.3%
Fosforo	0.023%
Calcio	0.014%
Azufre	0.014%
Magnesio	0.013%
Hierro	5 mg
Sodio	5 mg
Zinc	0.2 mg
Cobalto	0.2 mg
Manganeso	0.1 mg
Flúor	0.01 mg
Yodo	0.01 mg

2.5.- Importancia económica del tomate

La producción de tomate a nivel nacional, ocupa el primer lugar dentro de las especies hortícolas, por superficie sembrada alrededor de 55,888.04 ha. (SIAP, 2012) y a la cantidad de empleos que genera (Valenzuela, 2004).

En México, siendo los tipos roma, bola y cereza, los más populares en dicha modalidad de producción. En Tamaulipas, el cultivo de tomate se establece en una superficie de 2,000 a 2,500 ha, cuyo valor de la producción supera los \$500 millones de pesos (SIACON, 2010). En esta superficie se requieren entre 300 mil y 500 mil jornales por año, por lo que el impacto del cultivo se ve reflejado directamente en el arraigo de los habitantes del sector rural (De la Cruz, 2014).

2.6.- Importancia social del tomate

En nuestro país, como en otras partes del mundo, la preferencia por el consumo de tomate en fresco es predominante. Además, es utilizado como materia prima base para la elaboración de pastas, salsas, purés, jugos, etc. Renglones que han cobrado importancia en los últimos años gracias a los avances tecnológicos logrados para su procesamiento, así como los gustos y costumbres de las nuevas generaciones. Esta situación conlleva a mayores exigencias en la calidad para su distribución y venta en fresco, que a su vez determina renovados nichos y condiciones de mercado (Anónimo, 2010).

2.7.- Variedades

Más del 90% de la superficie se establece con variedades e híbridos de tomate tipo saladette, y la producción se destina principalmente para el mercado nacional; en muy pequeña escala se siembran tomates de especialidad (miniroma, cherry, de racimo, bola, de colores, etc.), los cuales se destinan a mercados de exportación o para cadenas de restaurantes (productos gourmet) (Ramírez, 2014).

En el caso específico de variedades, el Programa de Hortalizas del CEHUAS identificó al híbrido Toro de tomate tipo saladette como un material con alto potencial para la región de Tula Tamaulipas, y llegó a cubrir casi el 90% del área sembrada durante la anterior década (Ramírez, 2014).

En los últimos años continuó el proceso de evaluación de materiales con lo que se han identificado nuevas opciones: Tisey, Shanty, DRD 8549, los cuales pueden darle mayor seguridad de producción y calidad de fruto a los productores del sur de Tamaulipas y la Planicie Huasteca, por su superioridad sobre los testigos comerciales Toro y las variedades Gala y Río Grande (Ramírez, 2014).

2.8.- Producción mundial de tomate

En el año 2012, 10 países concentraron el 90 % de la producción mundial; la posición líder la ocupa Estados Unidos (sobre todo en California), seguido por China, Italia, y Turquía. El resto se cosecha en el hemisferio sur (Chile, Brasil, Argentina, Australia). Argentina, que ocupó el puesto 13 del ranking y participa en promedio con el 1 % del total mundial (Mendoza, 2013).

2.9.- Producción nacional de Tomate

De acuerdo con el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera en México se han reportado hasta el año 2012 en ciclos cíclicos y perennes, un total de 55,888.04 hectáreas, como se muestra a continuación en el siguiente cuadro.

Cuadro 2. Producción Agrícola, Ciclo: Cíclicos y Perennes 2012, Modalidad: Riego + Temporal de Tomate rojo (jitomate) Fuente SIAP 2012.

Ubicación	Sup. Sembrada (Ha)	Sup. Cosechada (Ha)	Producción (Ton)	Rendimiento (Ton/Ha)	PMR (\$/Ton)	Valor Producción (Miles de Pesos)
AGUASCALIENTES	313.00	313.00	10,749.90	34.34	4,002.49	43,026.39
BAJA CALIFORNIA	2,952.05	2,932.80	189,635.96	64.66	7,782.77	1,475,892.93
BAJA CALIFORNIA SUR	2,232.74	2,203.74	106,858.54	48.49	6,745.16	720,777.84
CAMPECHE	220.75	220.75	5,874.78	26.61	4,068.74	23,902.97
CHIAPAS	1,074.25	1,074.25	37,581.09	34.98	7,765.79	291,846.84
CHIHUAHUA	87.27	87.27	8,105.74	92.88	9,272.84	75,163.22
COAHUILA	695.50	695.50	59,180.84	85.09	6,373.68	377,199.99
COLIMA	191.50	191.50	6,458.00	33.72	3,195.29	20,635.20
DISTRITO FEDERAL	1.50	1.50	135.00	90.00	8,763.34	1,183.05
DURANGO	180.75	180.75	31,277.80	173.04	8,624.14	269,744.20
GUANAJUATO	896.73	896.73	78,440.39	87.47	3,093.31	242,640.58
GUERRERO	995.59	995.59	18,470.39	18.55	5,207.58	96,186.06
HIDALGO	564.58	564.58	17,708.89	31.37	6,196.23	109,728.31
JALISCO	2,079.98	2,055.18	156,660.03	76.23	7,355.11	1,152,251.60
MEXICO	1,281.37	1,281.37	80,073.76	62.49	7,025.52	562,560.05
MICHOACAN	5,062.00	5,006.00	171,038.52	34.17	3,055.99	522,691.93
MORELOS	2,256.50	2,256.50	71,202.90	31.56	5,719.77	407,264.41
NAYARIT	2,447.50	2,447.50	87,304.30	35.67	2,886.93	252,041.01
NUEVO LEON	524.70	514.30	38,612.18	75.08	5,131.55	198,140.33
OAXACA	972.72	967.97	96,744.42	99.95	5,573.93	539,247.02
PUEBLA	831.20	831.20	52,849.79	63.58	8,177.53	432,180.87
QUERETARO	154.00	154.00	27,773.45	180.35	6,773.76	188,130.75
QUINTANA ROO	61.37	61.37	1,399.08	22.80	4,408.63	6,168.02
SAN LUIS POTOSI	1,639.68	1,616.68	116,136.93	71.84	4,445.96	516,340.56
SINALOA	18,623.05	18,449.92	1,039,367.64	56.34	2,954.14	3,070,433.17
SONORA	1,448.70	1,388.20	82,323.87	59.30	4,299.99	353,992.21
TABASCO	47.00	40.00	498.80	12.47	6,001.16	2,993.38
TAMAULIPAS	1,876.20	1,737.20	45,104.70	25.96	5,018.62	226,363.32
TLAXCALA	8.00	8.00	170.00	21.25	4,470.59	760.00
VERACRUZ	2,920.25	2,870.25	58,141.04	20.26	4,796.51	278,874.11
YUCATAN	233.45	230.87	3,360.06	14.55	5,347.73	17,968.68
ZACATECAS	3,014.16	2,962.91	139,131.08	46.96	4,816.00	670,055.87

Total	55,888.04	55,237.38	2,838,369.87	51.38	4,631.67	13,146,384.85
-------	-----------	-----------	--------------	-------	----------	---------------

Los principales estados productores de Tomate en México son: Sinaloa (18,623.05 ha), Michoacán (5,062.00 ha), Zacatecas (3,014.16 ha) Baja California (2,952.05 ha), Veracruz (2,920.25 ha), Morelos (2,256.50 ha), Nayarit (2,447.50 ha) Baja California Sur (2,232.74 ha), Jalisco (2,079.98 ha) y Tamaulipas (1,876.20 ha), (SIAP, 2012).

2.10.- Principales plagas presentes en el tomate

A nivel mundial la presencia de hongos, bacterias, virus y nematodos en los sistemas de producción de Tomate ocasionan una serie de enfermedades, que dependiendo del grado de severidad con que se presenten y en la parte de la planta en que afectan, tienen un amplio impacto en pérdidas económicas y pueden ocasionar la afectación en la inocuidad de los productos por la presencia directa de estos organismos o bien por la contaminación con agroquímicos (FAO, 2011).

Esta hortaliza al igual que otros cultivos, se ve afectada por la incidencia de enfermedades que reducen el rendimiento, calidad de la cosecha e incluso la pérdida del cultivo aun que se conocen las enfermedades causadas por patógenos que viven en el suelo sobresalen las enfermedades foliares como Tizón temprano causado por *Alternaria solani*, Cenicilla polvorienta causada por *Leveillula taurica* entre otras (Rodríguez *et al.*, 1984).

Las enfermedades principales que atacan al cultivo son pudriciones de la raíz y ahogamiento (*Pythium sp.* y *Rhizoctonia solani*), pudriciones del cuello y raíz (*Phytophthora capsici*), tizón tardío (*Phytophthora infestans*), tizón temprano (*Alternaria solani*), cenicilla (*Leveillula taurica*), moho de la hoja (*Cladosporium fulvum*), mancha gris (*Stemphyllium solani*), marchitez (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*), pudrición de la corona y raíz (*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*), Moho blanco o pudrición blanca (*Sclerotinia sclerotiorum*) y moho gris (*Botrytis cinerea*) (Mendoza, 1996).

2.10.1.- Tizón temprano (*Alternaria solani*)

El tizón temprano se presenta en las áreas donde se cultiva tomate. Es destructivo en Inglaterra, India, Australia, y los Estados Unidos. Cuando la enfermedad se desarrolla en plántulas o semilleros son susceptibles al ahogamiento y a la pudrición del cuello, causando pérdidas severas (Jones *et al.*, 2001).

Las especies de *Alternaria* tienen la habilidad de penetrar directamente al tejido epidérmico por estomas y heridas. La infección en tubérculos de papa ocurre principalmente a través de heridas causadas durante la cosecha.

El tizón temprano (*Alternaria solani*) ataca papa, tomate y berenjena y se encuentra distribuido ampliamente en las zonas tropicales y templadas del mundo donde se cultiva tomate y papa (Rodríguez *et al.*, 1984). En México, se ha encontrado en Morelos, Sinaloa, Michoacán, Baja California, Yucatán, San Luís Potosí, Tamaulipas, Guanajuato, Estado de México y otras áreas pequeñas donde se cultivan estas solanáceas, ocasionando tizones en hojas y pudriciones de frutos, afecta también pecíolos, flores, tallos y tubérculos en papa (Mendoza y Pinto, 1983 y Ramirez, 2014). Otras especies de *Alternaria* afectan a la parte aérea del tomate. Son *Alternaria tomato*, que ocasiona pequeñas manchas en forma de «cabeza de clavo»; y, *Alternaria alternata* f. *Sp lycopersici* que causa el denominado Tizón del tallo.

Esta última ejerce su parasitismo en hojas, tallos y frutos, provocando síntomas análogos a los de *A. solani*, aunque presenta una variante de interés. El micromiceto produce una toxina que de manera sistémica llega a la copa de la planta, necrosando las zonas internerviales de los folíolos hasta el punto de secarlas (Nuez, 1999).

2.10.1.1.- Ciclo biológico y epidemiología

El patógeno inverna en otras solanáceas o puede sobrevivir como conidios por más de un año en los residuos de las plantas atacadas. Es más probable que la infección primaria sea causada por el hongo que está en el suelo, contribuyendo a ella los días lluviosos o húmedos y la temperatura ambiental de 24°C. Los conidios germinan a un óptimo de entre los 28 y 30°Cy con humedad relativa alta (Mendoza, 1996).

Se transmite por conidios dispersados por salpicaduras o viento, las condiciones secas favorecen su liberación; el máximo de concentración de esporas en el aire tiene lugar cuando la velocidad del viento es máxima y la humedad relativa mínima.

Cuando las condiciones son favorables germinan sobre la planta y penetran directamente, o por aberturas invade a los tejidos de las hojas, tallos y frutos formando un micelio intercelular, el cual origina los conidios sobre los tejidos infectados, estos son liberados y acarreados por el viento pudiendo caer sobre plántulas, atacándolas a nivel del cuello, sobre tallos, hojas y tubérculos. Si las condiciones le son favorables a este hongo se reproduce abundantemente reinfectando continuamente a las plantas (Mendoza y Pinto, 1985).

2.10.1.2.- Síntomas y daños

En las hojas se presentan pequeñas manchas circulares de color café frecuentemente rodeadas de un halo amarillo. Las manchas tienen la característica de tener anillos concéntricos de color oscuro. Usualmente las manchas aparecen en las hojas más viejas y de éstas suben al resto de la planta. A medida que la enfermedad progresa, el hongo puede atacar los tallos y las frutas. Las manchas en las frutas son similares a las de las hojas con color café y anillos concéntricos oscuros. En los anillos concéntricos se producen esporas polvorientas y oscuras. Las esporas se pueden observar si a la lesión se le acerca un objeto de coloración clara (Mendoza, 1996).

En las hojas atacadas aparecen inicialmente con manchas circulares o angulosas de color café oscuro a negro, las cuales aumentan de tamaño y forman anillos concéntricos, dándole a la lesión una apariencia característica, las manchas pueden coalescer y dañar toda la hoja. Las hojas fuertemente atacadas se tornan amarillas y se caen. Si el ataque es severo se defolia toda la planta, lo que además de debilitarla, deja los frutos expuestos a quemaduras de sol; por lo general el ataque empieza en las hojas viejas (Mendoza, 1996; Sánchez, 1980).

2.10.2.- Cenicilla (*Leveillula taurica*)

La cenicilla (*Leveillula taurica* (Lev.) Arn.) es uno de los patógenos de mayor relevancia en el cultivo de chile bajo condiciones de invernadero, porque es uno de los cultivos solanáceos más susceptible (De Souza y Cafe, 2003; Guzmán, *et al.*, 2003). Esta enfermedad se detectó en los Estados Unidos en 1978 y en México a partir de 1980 (Sánchez, 1983; Mendoza, 1992; Velásquez y Valle, 1999; Guzmán, *et al.*, 2003; Velásquez y Medina, 2005).

2.10.2.1.- Distribución

La cenicilla es una de las enfermedades más distribuidas en todas las regiones y una de las más frecuentes en todos los invernaderos donde se cultiva jitomate (Guzmán, *et al.*, 2003), pimiento morrón y algunos otros tipos de chile (De Souza y Cafe, 2003), ya que se puede desarrollar tanto en climas húmedos como en secos, debido a que ataca en un rango amplio de temperaturas. Algunas referencias, la clasifican como una enfermedad de climas secos (APS, 2003), aunque existen otros trabajos en donde se indica una falta de relación entre los factores climáticos y la presencia de este patógeno (Velásquez y Medina, 2005).

2.10.2.2.- Hospederos

El cultivo de chile es uno de los más susceptibles al ataque de este patógeno, aunque la variedad de hospedantes es amplia abarcando plantas de varias familias botánicas entre las que sobresalen Solanaceae (*Capsicum* spp, *Solanum melongena*, *Solanum gilo*, *Nicandra physaloides*, *Lycopersicon esculentum*); Cucurbitaceae (*Cucumis sativus*); Malvaceae (*Abelmoschus esculentus*); Asteraceae (*Cynara scolymus*, *Emilia sonchifolia* y *Sonchus oleraceus*); Euphorbiaceae (*Euphorbia pulcherrima* y *E. heterophylla*) y Chenopodiaceae (*Chenopodium ambrosioides*) (De Souza y Cafe, 2003).

2.10.2.3.- Organismo causal

El organismo causal, *Oidopsis sícula* Scalia (Syn. *O. taurica* E. S. Salmon; teleomorfo *Leveillula taurica* G. Arnaud) (APS, 2003). Presenta un micelio endofítico y los conidios presentan dimorfismo. La fase asexual o conidial *Oidiopsis taurica* se caracteriza por formar coniódoforos hialinos, septados, ramificados, a veces en grupos de 2 a 3; conidios no en cadena, hialinos de dos tipos: unos en forma de barril y otros piriformes de 13.5 por 55.7 micras y de 15.2 por 62.5 micras, respectivamente. La fase sexual *Leveillula taurica* se caracteriza por formar cleistotecios con varias ascas y apéndices micelioides o carece de ellos (Mendoza, 1992; Braun *et al.*, 2002).

2.10.2.4.- Sintomatología

Los síntomas se ubican primero sobre el tejido foliar maduro de las plantas mayores, como manchas cloróticas sobre el haz de las hojas, seguidas por la esporulación a través del estoma, sobre el área correspondiente del envés de la hoja. La enfermedad progresa y los síntomas aparecen sobre hojas jóvenes, las áreas

cloróticas coalescen y se convierten en áreas necróticas. Finalmente, la esporulación se observa sobre el haz de las hojas seguida por la abscisión de las mismas (Reuveni *et al.*, 1974; Mendoza, 1992; APS, 2003).

2.10.2.5.- Ciclo biológico

El hongo sobrevive el invierno como micelio o conidios en residuos de cosecha y sobre otras plantas hospedantes cultivadas (tomate, berenjena, algodón, entre otras) o no cultivadas (malas hierbas); o bien como cleistotecio en el suelo, o en algunas malezas como *Sonchus oleraceus* L y *Physalis* sp. (Mendoza, 1996).

El ciclo inicia cuando los conidios descienden sobre la hoja de chile. El conidio germina como semilla e inicia su crecimiento sobre la hoja. La cenicilla parasita la planta utilizándola como fuente de alimento. El hongo inicialmente crece de manera interna, en un periodo de latencia aproximado de 18-21 días.

Luego crece de manera externa a través de las estomas, sobre la superficie del envés de la hoja, produciendo más conidios, los cuales están ubicados en finos y numerosos conidióforos. Estos conidióforos se hacen visibles como manchas amarillentas o colonias sobre el envés de la hoja.

Las corrientes de aire dentro del invernadero llevan estos conidios infecciosos y microscópicos a más plantas. Las esporas se dispersan después a través de las ventilas y mallas. Además de dispersarse a través de las corrientes de aire, la cenicilla se puede establecer en plantas ornamentales, malezas y por la ropa de los trabajadores (Ministry of Agriculture and Lands, 2004).

2.10.2.6.- Epidemiología

Se sabe que este patógeno prefiere climas secos para desarrollarse. La cenicilla del chile germina a diferentes humedades relativas, desde 0 a 100%, cuando la temperatura se encuentra entre 10 y 35 °C. Bajo condiciones ambientales óptimas de HR entre 90-95% y temperaturas entre 15 y 25 °C los conidios germinan e infectan al hospedante en 24 a 48 h. (APS, 2003).

También es conocido que este patógeno es un parásito obligado, es decir, es difícil lograr su reproducción en medios distintos al tejido vivo, aunque se han hecho intentos por lograr regenerarlo en medios artificiales, con el fin de utilizarse en estudios de tipo epidemiológico y genético (Nicot *et al.*, 2002).

Las evidencias recientes indican que los conidios del patógeno una vez depositadas en la hoja del hospedante, liberan un material extracelular conidial que sirve para fijarse en la superficie foliar, lo cual es vital para la diseminación del patógeno; esta sustancia se considera como una de las señales que tiene el conidio para preparar la invasión hacia las células del hospedante, permitiendo maximizar la posibilidad de que el tubo germinativo penetre hacia su objetivo (Nicot *et al.*, 2002).

2.10.3.- Verticilosis (*Verticillium dahliae*)

Verticillium dahliae es un hongo de suelo que produce enfermedades denominadas Verticilosis, responsables de importantes pérdidas en una amplia gama de especies cultivadas, entre las que destacan algodón, cultivos hortícolas y olivo (López *et al.*, 2003).

2.10.3.1.- Hospederos

Dentro de los cultivos se encuentran; Girasol, Olivo, Papa, Pimiento, Tomate, berenjena y algodón.

2.10.3.2.- Sintomatología

En el cultivo de tomate, el primer indicio de la enfermedad es un marchitamiento pasajero durante las horas más calurosas del día y una recuperación a la noche; este marchitamiento más tarde se hace permanente. Luego se detecta clorosis y amarillamiento marginal e internerval de los folíolos dando una característica mancha en V cuya parte más ancha queda en el borde del folíolo; luego este tejido se necrosa tomando color pardo, pero siempre conservando un halo amarillo (Polack y Mitidieri, 2002).

El amarillamiento de las hojas se debe, en parte, a la acción de las toxinas que produce el hongo. La enfermedad avanza de abajo hacia arriba. El hongo invade los vasos, por ello los síntomas a menudo aparecen en forma sectorial, abarcando solo un lado de la planta o un lado de la hoja; es más evidente durante períodos secos. El marchitamiento foliar es seguido por necrosis y enanismo. Si se corta el tallo afectado se ve un cambio de coloración en los vasos: gris amarillo o pardo claro. Aunque la mancha en V es bastante característica de síntomas de marchitez similares pueden ser causados por otros hongos (*Fusarium oxysporum* pv. *lycopersici*) o bacterias (*Clavibacter michiganensis*) o bien por estrés hídrico. Por este motivo, el diagnóstico definitivo debería basarse en estudios de laboratorio (Polack y Mitidieri, 2002).

2.10.3.3.- Ciclo biológico

V. dahliae es un hongo habitante del suelo asociado con las raíces de las plantas sea como comensal sin producir síntomas o como parásito que invade el sistema vascular. Sobrevive en el suelo en forma pasiva como microesclerocios que se mantienen viables durante muchos años (hasta ocho). Las malezas pueden actuar como reservorios a menudo sin presentar síntomas. Plantines infectados y semilla pueden llevar la enfermedad a campos libres del hongo. Los microesclerocios son transportados por el agua y el viento.

Los microesclerocios germinan y las hifas penetran en las raíces, pasando a los vasos; allí el hongo esporula y los conidios son llevados por la corriente ascendente del xilema llegando a distintas alturas en el tallo donde interrumpen el transporte de agua por obstrucción y producen toxinas que causan marchitamiento. Recién al final del ciclo de cultivo se forman los microesclerocios en los tallos invadidos que son incorporados con los restos al suelo. Se trata de una típica enfermedad monocíclica (Polack y Mitidieri, 2002).

2.11.- Pruebas moleculares.

En el área de producción de hortalizas, existen diversos organismos plagas y enfermedades ocasionando severos daños en los cultivos llegando a ocasionar pérdidas económicas muy severas, razón por la cual la agronomía a enfocado una rama de estudio realizando una serie de investigaciones acerca de estos organismos que van desde su identificación, ciclo biológico hasta implementar medidas de control.

Actualmente gracias a los avances científicos y tecnológicos, el identificar organismos patógenos ha resultado una tarea más práctica y menos complicada, dado que el desarrollo de la biología molecular nos ha brindado herramientas fundamentales y una serie de metodologías a seguir que día a día se han ido modificando con el fin de mejorar las técnicas para la obtención de mejores resultados.

Por su parte la identificación tradicional de especies de hongos se basa principalmente en el aislamiento del microorganismo en medio de cultivo y la posterior observación de las características morfológicas. Esta metodología es laboriosa y requiere de conocimiento amplio para diferenciar entre especies estrechamente relacionadas. Actualmente, en la identificación de microorganismos se están utilizando pruebas moleculares en las que se extraen ácidos nucleicos y

después se amplifican mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Estas técnicas basan su utilidad al explotar secuencias polimórficas dentro de los espacios internos transcritos (ITS1 e ITS2) del ADN (Lorena y Melgarejo, 2009).

Por su parte Ochoa *et al.*(2012), menciona en sus investigaciones la extracción de ADN se realizó mediante el método de Doyle y Doyle (1990). El producto de la extracción se visualizó en un gel de agarosa al 1% mediante electroforesis.

Posteriormente se amplificó mediante el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) las regiones internas transcritas ITS1 e ITS4 entre los genes ribosomales (rDNA) 18S-5.8S y 5.8S-28S utilizando el par de iniciadores de secuencia ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG)/ ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) colocando en cada muestra buffer de enzima a 1x, 1 µL; dNTP's a 0.2 mM, 1 µL; MgCl a 2 mM, 0.4 µL; ITS1 a 1 pM, 0.5 µL; ITS4 a 1 pM, 0.5 µL; 0.5 UDO de Taq-polymerasa, 0.1 µL; DNA problema ajustado a 50 ng, 1 µL; y 5.5 µL de agua ultrapura estéril para ajustar un volumen final de 10µL.

Las condiciones de la reacción de PCR fueron: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C por 5min, 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 10 segundos, 30 ciclos de alineamiento a 57 °C por 30 segundos, 30 ciclos de extensión a 72 °C por 2 min. y 1 ciclo de extensión final a 72 °C por 5 min.

La amplificación se visualizó en un gel de agarosa al 1% mediante electroforesis. El producto de PCR se purificó con el kit de purificación de bandas de In vitro gen (PureLink® Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit), y se secuenció en dos direcciones (5' a 3' y 3' a 5') con un secuenciador automático. Los pares de base obtenidos se compararon con las secuencias reportadas en la base de datos del banco de genes del NCBI (National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nih.gov) mediante el programa BLAST.

Por otro lado Allende *et al.* (2012), menciona en su investigación que para la extracción del ADN, se utilizó el micelio de una colonia crecida durante tres días en medio MEA. El ADN se extrajo siguiendo la técnica de Ahrens y Seemuller (1992), la cual consiste en tomar micelio en crecimiento en el medio de cultivo.

El micelio se depositó en un mortero y se homogenizó con 1 mL de buffer de extracción CTAB (Tris 1 M, pH = 8; NaCl 5 M; EDTA 5 M, pH 8; CTAB 2 %, PVP 1 %); posteriormente, se incubó a 65 °C durante 30 min. La cantidad y calidad del ADN extraído se determinó midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm de longitud de onda en un biofotómetro 6131 Eppendorf; la integridad, se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 %, teñidos con bromuro de etidio.

Las muestras de ADN se almacenaron a -20 ° C para su posterior uso. Amplificación de un fragmento de las regiones ITS 1 / ITS 2. Se amplificó un fragmento de las regiones internas ITS1 e ITS4 (Internal Transcribed Spacer) entre los genes ribosomales (ADNr) 18S - 5.8S y 5.8S - 28S al utilizar los iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') / ITS2 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990).

Se utilizó el sistema Promega GoTaq Flexi DNA Polymerase y la mezcla de reacción se llevó a las siguientes concentraciones de cada uno de los componentes: 1 X de GoTaq Flexi Buffer, 2 µM de MgCl 200 µM de dinucleótidos 2, trifosfatados (dNTP's), 1 U de GoTaq Polymerase, 0.2 µM de cada iniciador, 200 ng de ADN de *Penicillium sp.* y el resto de agua nanopura estéril, para un volumen total de 50 µL .

La amplificaciones se realizaron con un ciclo inicial para la activación de la enzima Todas las Reacciones en Cadena de la Polimerasa (PCR) se llevaron a cabo en un Peltier Thermal Cycler PTC200 (BIORAD, México), las amplificaciones se verificaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1 % preparado con amortiguador Tris - Acetato - EDTA 1X y corrido en el mismo amortiguador a 87 V cm aproximadamente 1 h. El gel se tiñó con 1 µL de bromuro de etidio (10 mg mL) y las bandas se visualizaron en un transiluminador UV.

Secuenciación del fragmento amplificado. El producto de PCR obtenido con los iniciadores ITS 1/ITS 4 se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1 %, observándose una banda de 590 pb. Posteriormente, el fragmento amplificado con los iniciadores se purificó con el sistema Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Cat. A9281 Madison, WI, USA). La secuenciación se realizó por electroforesis capilar con un secuenciador automático ABI PRISM 310 (Genetic Analyzer PE Applied Biosystems), en la unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

La secuencia de nucleótidos obtenida se comparó con una búsqueda de secuencias homólogas usando el algoritmo BLASTX (Altschul et al., 1990), en la base de datos del banco de genes del NCBI (National Center for Biotechnology Information www.ncbi.nlm.nih.gov).

III.- MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, en el departamento de Parasitología en el Laboratorio de Toxicología.

3.1.- Etapa experimental 1: Obtención de los patógenos a partir de muestras de hojas de tomate en Papa Dextrosa Agar

3.1.1.- Material vegetal

De la variedad Juan Pablo, adquirida de un muestreo en un invernadero en producción localizado en Tula, Tamaulipas, México. Dichas muestras fueron recolectadas de dos parcelas diferentes las cuales se clasificaron en dos tipos para separarlas, recibiendo el nombre de Juan Pablo 1 y Juan Pablo 2. Esto para referirse a la parcela 1 y a la parcela 2 con la misma variedad de tomate, el muestreo se realizó al azar en cada una de las parcelas recolectando hojas dañadas, aproximadamente 20 hojas por parcela. Se colocaron en bolsas ziploc para conservarlas en refrigeración para su posterior procesamiento.

3.1.2.- Desinfección de las hojas de tomate

Se retiraron de la bolsa ziploc colocando las hojas sobre papel estraza para eliminar la humedad en las hojas, posteriormente se observaron los síntomas de en las hojas y se colocaron por separado de acuerdo a las lesiones en las partes de las hojas (Lesiones en el ápice, borde y en las partes céntricas de la hoja), procediendo a preparar una solución de cloro al 2% (5mL de Cl / 250mL de H₂O), dividiendo en tres vasos de precipitado de 50 mL, mas tres vasos de precipitado con agua destilada estéril para realizar el lavado de muestras.

Posteriormente, en condiciones totalmente asépticas y bajo una campana de flujo laminar se realizaron pequeños cortes de hojas dañadas, cortando una pequeña parte de tejido enfermo y parte de tejido sano, en seguida se colocaron en

la solución de cloro al 2% por 1 minuto, una vez transcurrido el tiempo se introdujeron en una solución de agua destilada por 30 segundos repitiendo este paso 3 veces, para eliminar residuos del desinfectante y finalmente colocar los cortes sobre papel sanitas para eliminar el residuo de agua y dejar secar totalmente las muestras en la campana de flujo laminar. El método anterior se repite para cada tipo de lesión (en el ápice, borde y en las partes céntricas de la hoja).

3.1.3.- Siembra de las muestras de hojas de tomate

Una vez secas las muestras, se colocaron cuatro trocitos de hojas por caja petri con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA), sellando la caja con cinta y rotulando la caja con el nombre de la muestra o variedad, nombre de la lesión que presentó, cultivo y la fecha de siembra. Posteriormente se incubaron las cajas sembradas a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$ por 48 horas.

3.2.- Etapa experimental 2: Aislamiento de los patógenos

3.2.1.- Incremento del inóculo por siembra directa

Se procedió a separar las diferentes colonias de las especies fúngicas, para realizar la purificación del hongo, se tomó un explante de cada cepa con un sacabocados estéril, se sembró en PDA y se dejó incubar durante 24 horas a una temperatura aproximada de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$.

3.2.2.- Aislamiento por punta de hifa

Para la realización de esta técnica se procedió a desinfectar la campana de flujo laminar con alcohol al 70% por 1 minuto, desinfectarse muy bien las manos con alcohol al 70%, de los explantes puestos a incubar por 24 horas se observó en

el microscopio estereoscópico el crecimiento de las hifas, se localizó un hifa utilizando preferentemente la que más sobresalga del crecimiento.

En seguida con una jeringa de insulina (con aguja de 13 mm) desinfectada, se cortó un fragmento de la hifa, con la misma aguja, se tomó el fragmento con un poco de medio de cultivo (PDA), colocándolo al centro de una nueva caja petri con medio de cultivo (PDA), se selló con cinta, rotulando la caja con el nombre de la muestra o variedad, nombre de la lesión que presento, cultivo y la fecha de siembra. Posteriormente se incubaron las cajas sembradas a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$ por 8 días para obtener cepas puras de los hongos con estructuras de reproducción (conidióforos y conidios).

3.3.- Etapa experimental 3: Identificación de las especies de hongos por morfología presentes en las muestras de hojas de tomate

Para la realización de la identificación morfológica se utilizaron los aislamientos puros del patógeno, realizando montajes de estructuras en desarrollo, tomando la mínima cantidad, depositado las estructuras sobre la gota de lactofenol azul y colocar el cubreobjetos lo más preciso posible para tener una buena observación de estructuras, por último se compararon las características en un microscopio compuesto y mediante claves de identificación (Barnett y Hunter, 1972), se determinó el patógeno. Posteriormente se selló la muestra y se etiquetó con el nombre del patógeno, para después tomar una fotografía con una cámara (Olympus) y se documentó la imagen.

3.4.- Etapa experimental 4: Identificación molecular por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la realizar la identificación molecular, se procedió a realizarse únicamente a los géneros de hongos que no se lograron identificar

morfológicamente y por la carencia de sus cuerpos fructíferos. Por ello se procedió a utilizar la siguiente metodología:

De los aislamientos puros de los géneros se sembraron nuevamente en medio de cultivo PDA, posteriormente se dejaron crecer hasta cubrir toda la caja petri, para obtener muestra suficiente para extracción de ADN.

3.4.1.- Extracción del Acido Desoxirribonucleico (ADN)

Para la extracción del ADN, se utilizó el micelio de una colonia crecida durante cinco días en medio de cultivo PDA, dividiendo la caja en cuatro partes o para cuatro muestras. El ADN se extrajo siguiendo la técnica de Doyle y Doyle (1990) modificado por Vázquez, la cual consiste en tomar 0.2 g de micelio en crecimiento en el medio de cultivo.

El micelio fue depositado en un tubo eppendorf de 1.5 mL, se homogenizó con 1 mL de buffer de extracción (Tris HCl 1M, pH =8; Na Cl 0.29 g; EDTA 1M pH =8.5; SDS 2% = 2 g); posteriormente, se agitó el macerado con un Vortex por 30 segundos, se colocó en hielo por 15 minutos, se agregó Cloroformo (Alcohol-isoamilico 24:1), nuevamente se agitó con Vortex por 30 segundos, centrifugar a 12,000 revoluciones / minuto / 15 minutos.

Posteriormente, se extrajo el sobrenadante y se pasó a un tubo eppendorf de 1.5 mL y se anotó la cantidad extraída, en seguida se agregó Isopropanol (Alcohol-Isopropilico) el mismo volumen que se extrajo de sobrenadante, se volvió a colocar el hielo por 15 minutos, centrifugando a 12,000 rpm/10 minutos, decantando el sobrenadante, se dejó el precipitado “pastilla”, se suspendió en 50 µL de H₂O inyectable y se mantuvo a temperatura bajo 0°C., para su posterior uso.

3.4.2.- Electroforesis

Se realizó una electroforesis para observar la presencia de bandas de ADN, razón por la cual se procedió a preparar un gel de Agarosa.

3.4.3.- Preparación del Gel de Agarosa

Se pesó 1.0 g de agarosa, disolviéndolo en un vaso de precipitado con 100 mL de TAE a 1X sobre un Termo-agitador hasta que se observó la solución muy transparente, en seguida se retiró el vaso del Termo-agitador y se dejó enfriar un poco, se le agregó 3 μ L de bromuro a la solución, homogenizando muy bien, y se vació la solución sobre el contenedor del sistema de electroforesis, colocando el peine para hacer las ranuras en el gel y se dejó solidificar.

Posteriormente, se retiró el peine para poder cargar el gel de Agarosa con los siguientes reactivos y sus respectivas cantidades:

Cuadro 3. Reactivos y cantidades a utilizar para cargar el gel de Agarosa.

Para 1 muestra	Para 8 muestras
0.5 μL de bromuro	4 μL de bromuro
4 μL de buffer de carga	32 μL de buffer de carga
3 μL de ADN	3 μL de ADN/muestra

Una vez realizado lo anterior, se corrió el gel de Agarosa en el sistema de electroforesis a 90V por 1h 40 min., con TAE a 1X, transcurrido este tiempo se sacó el gel de Agarosa con una espátula, colocándolo en el Foto-documentador, para tomar fotografía de las bandas de ADN y documentar la fotografía.

3.4.4.- Espectrofotometría

Se realizó una espectrofotometría para cuantificar el ADN, mediante la siguiente metodología:

Utilizando una muestra de ADN y H₂O inyectable; se tomó 990 µL de H₂O inyectable depositándolos en un tubo de ensayé de 5 mL, en seguida, se agregó 10 µL de ADN, depositándolos en el mismo tubo de ensaye de 5 mL, homogenizando muy bien, repitiendo lo anterior para cada una de las muestras de ADN.

A continuación se encendió el Espectrofotómetro, seleccionando la opción de cuantificar el ADN, a una Absorbancia 260y 280, iniciando por medir un blanco (H₂O inyectable para calibrar el aparato) colocando 1mL de H₂O en la celdilla de cuarzo, se introdujo la celdilla en el Espectrofotómetro, después, de la misma manera se midieron las muestras con ADN y se tomó nota de las cantidades como se mostraban en el Espectrofotómetro.

3.4.5.- Cálculos de ADN.

Se realizaron para preparar el coctel de PCR, utilizando las siguientes formulas y equivalencias:

Formulas:

1.- $\mu\text{g totales o } \mu\text{g/mL} = (\text{Absorbancia } 260) (100) (50).$

2.- $C1V1=C2V2$ Despejando $V1= C2V2/C1.$

Equivalencias:

$1 \mu\text{g} = 1,000 \text{ ng.}, 1 \mu\text{g} = 1,000,000 \text{ pg.}, 1 \text{ gr} = 1,000 \mu\text{g.}, 1\text{mL} = 1,000 \mu\text{L}.$

3.4.6.- Preparación del coctel de PCR

Se utilizó para realizar la PCR, para ello se siguió la siguiente metodología:

Una vez obtenido las concentraciones de los cálculos de ADN, se utilizaron las cantidades de ADN en μL , para preparar el coctel, inicialmente se hizo el cálculo de los componentes a utilizar como se muestra en el siguiente cuadro:

Cuadro 4. Componentes y cantidades a utilizar para la preparación del coctel de PCR.

Componente	Para 1 muestra	Para 8 muestras
ITS1 10 μM	ITS1 0.5 μL	H ₂ O inyectable 148 μL
ITS4 10 μM	ITS4 0.5 μL	ITS1 4 μL
Taq 5x	Taq-GO 5 μL	ITS4 4 μL
Mastermix		
Agua N.F	H ₂ O inyectable 18.5 μL	Taq-GO 40 μL
(Nucleose Free)		
ADN templado	Variable	Variable
100 ng/ml		
Volumen total =	25 μL	

Una vez establecido lo anterior se agregaron 148 μL de H₂O inyectable en un tubo eppendorf de 1.5 mL, introduciendo 4 μL de ITS1 (Internal Transcribed Spacer 1) de secuencia (TCCGTAGGTGAACCTGCGG), se agregó 4 μL de ITS4 (Internal Transcribed Spacer 4) de secuencia (TCCTCCGCTTATTGATATGC) en el mismo tubo, posteriormente, se añadió 40 μL de Taq-GO (Taq DNA Polymerase), homogenizando muy bien, obteniendo un volumen final de 196 μL de coctel y se colocó el tubo eppendorf en hielo para conservar las enzimas.

Posteriormente en tubos eppendorf de para PCR, se agregaron 24.5 μL del coctel a cada tubo eppendorf, adicionando la cantidad de ADN necesaria por muestra según los cálculos y cantidades en μL obteniendo un volumen final de 25 μL por tubo eppendorf o muestra.

Finalmente, se selló muy bien cada tubo eppendorf, marcándolos según sea la muestra, conservando los tubos sobre hielo para su posterior uso, posteriormente se encendió el Termociclador para ser programado, seleccionando la opción de Taq-GO establecida como se muestra en el siguiente cuadro:

Cuadro 5. Programa para Taq-GO (Taq DNA Polymerase), en el Termociclador.

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	95°C	30 segundos	1
Alineamiento	95°C	30 segundos	
	60°C	1 minuto	30
	68°C	1 minuto	
Elongación	68°C	5 minutos	1
Hold temperatura		4°C	

En seguida, se acomodaron los tubos eppendorf en el Termociclador, alineándolos al centro, serrando la cubierta para iniciar el comienzo de los ciclos, al término de los ciclos de la PCR, se sacaron los tubos del Termociclador, colocándolos en una gradilla y se conservaron a temperaturas bajo 0°C.

3.4.7.- Electroforesis

Se realizó una electroforesis para observar la presencia de bandas amplificadas de ADN producto de PCR, razón por la cual se procedió a preparar un gel de Agarosa.

3.4.8.- Preparación del Gel de Agarosa

Se pesó 1.0 g de Agarosa, disolviéndolo en un vaso de precipitado con 100 mL de TAE a 1X sobre un Termo-agitador hasta que se observó la solución muy transparente, en seguida se retiró el vaso del Termo-agitador y se dejó enfriar un poco, se le agregó 3 µL de bromuro a la solución, homogenizando muy bien, y se vació la solución sobre el contenedor del sistema de electroforesis, colocando el peine para hacer las ranuras en el gel y se dejó solidificar.

Posteriormente, se retiró el peine para poder cargar el gel de Agarosa con los siguientes reactivos y sus respectivas cantidades:

Cuadro 6. Reactivos y cantidades a utilizar para cargar el gel de Agarosa para PCR.

Para 1 muestra	Para 10 muestras
0.5 μL de bromuro	5 μL de bromuro
2 μL de buffer de carga	20 μL de buffer de carga
---	4 μL de marcador molecular
2 μL de ADN	2 μL de ADN/muestra

Una vez realizado lo anterior, se corrió el gel de Agarosa en el sistema de electroforesis a 60V por 1hr. 40 min., con TAE a 1X, transcurrido este tiempo se sacó el gel de Agarosa con una espátula, colocándolo en el Foto-documentador para tomar fotografía de las bandas amplificadas de ADN, dichas bandas se tienen que situar entre 500 a 600 pares de bases (pb), se documentó la fotografía y se conservó el gel de Agarosa para su posterior elusión o extracción de las bandas amplificadas.

3.4.9.- Purificación de bandas amplificadas del gel de Agarosa producto de PCR

Para realizar la purificación se utilizó el kit de extracción de bandas (Quick Clean II Gel extraction kit), precediendo a cortar las bandas de ADN en el gel de Agarosa con un bisturí estéril, minimizando el tamaño del corte del gel eliminando la agarosa extra, pesando la porción del gel, no debe ser mayor a 400mg, se añadieron 3 volúmenes de Binding buffer II 3:1 por cada una de la porción de este gel (100 mg = 300 μ L de B.buffer II o 0.350 mg = 1050 μ L), se incubaron en el Thermo-Mixer a una temperatura de 55°C por 10 minutos, al término se añadió 1 volumen de Isopropanol (Alcohol Isopropilico) 1:1 por cada peso en mg del gel (0.300mg = 300 μ L de Isopropanol), se transfirieron las muestras a columnas Spin, centrifugando a 6000 xg por 1 minuto, desechando el filtrado hasta que la muestra se procese completamente, hasta terminarse todo el líquido contenido en el tubo, si la cantidad fue mayor a los 750 μ L se volvió a centrifugar usando la misma columna, posteriormente, se agregó 500 μ L de B. buffer a cada columna Spin, centrifugando a 12,000 xg por 30 a 60 segundos, y se desechó todo el filtrado.

En seguida, se añadió 750 µL de Wash buffer a cada columna Spin, centrifugando a 12,000xg por 30 a 60 segundos, se desechó todo el filtrado, nuevamente se volvió a centrifugar a 12,000xg durante 1 minuto, después se transfirieron cada columna Spin a un tubo eppendorf estéril, donde se les añadió 30 a 100 µL de Elution Buffer dd H₂O o TE a cada columna Spin, se dejaron reposar por 1 minuto a temperatura ambiente.

Finalmente, se centrifugaron a 12,000 xg por 1 minuto, donde el buffer en el tubo eppendorf contiene el ADN, el extracto de ADN se conservó a -20°C para su posterior uso.

3.4.10.- Secuenciación de las muestras de ADN producto de la PCR

Para la secuenciación de las muestras de ADN se enviaron secuenciar donde se secuenció en dos direcciones (5' a 3' y 3' a 5') con un secuenciador automático. Los pares de base obtenidos se compararon con las secuencias reportadas en la base de datos del banco de genes del NCBI (National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nih.gov) mediante el programa BLAST.

IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.- Etapa experimental 1: Obtención de los patógenos a partir de muestras de hojas de tomate en Papa Dextrosa Agar

4.1.1.- Siembra de las muestras de hojas de tomate

Al realizar la siembra de las muestras de hojas de tomate en PDA se obtuvo crecimientos de 30% en las placas petri de *Alternaria spp.* (Imagen A) y en el resto de ellas fue creciendo otros organismos contaminantes (Imagen B). El género *Alternaria solani* es el agente causal de “Tizón temprano” enfermedad que afecta al cultivo del tomate y varias hortalizas de la familia Solanaceae. Ocasionando tizones en hojas y pudriciones de frutos, afecta también pecíolos, flores, tallos y tubérculos en papa (Mendoza y Pinto, 1983).

En las muestras de hojas de tomate variedad Juan Pablo se observaron necrosis en las partes céntricas de las hojas con un pequeño anillo amarillo alrededor de la necrosis, por su parte Castro (2011), menciona que el síntoma más característico es la aparición de manchas irregulares oscuras rodeadas de un halo amarillento que se desarrolla como anillo las manchas aumentan de tamaño y en ataques fuertes se juntan hasta ennegrecer completamente las hojas. Brandan *et al.*, (2009), menciona que *Alternaria solani*, provoca la aparición en hojas de manchas más o menos redondeadas de color negruzco rodeadas por círculos concéntricos delimitados por un velo amarillo.

Mazzanti *et al.* (2010), menciona que en el cultivo del tomate, los síntomas en las hojas son característicos de la enfermedad: manchas circulares de hasta medio centímetro de diámetro, pardas con anillos concéntricos semejantes a un blanco de tiro; solitarias o en gran número en las hojas.

El tizón o marchitez temprana es una enfermedad que afecta órganos aéreos del tomate, en particular las hojas, sobre las cuales provoca manchas necróticas características que reducen la capacidad fotosintética de la planta y en casos graves desembocan en defoliación severa (Mónaco *et al.*, 2001).

Los resultados fueron similares en las muestras procesadas de las diferentes lesiones para las 2 muestras (Juan Pablo 1 y 2). Nótese la presencia de organismos contaminantes.

Figura 1. Diferentes crecimientos y coloraciones en las muestras (imagen A y B).

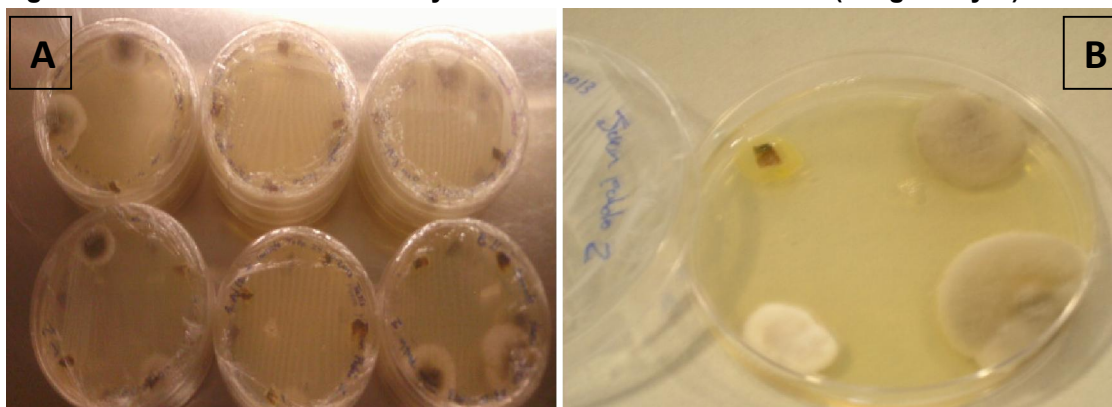
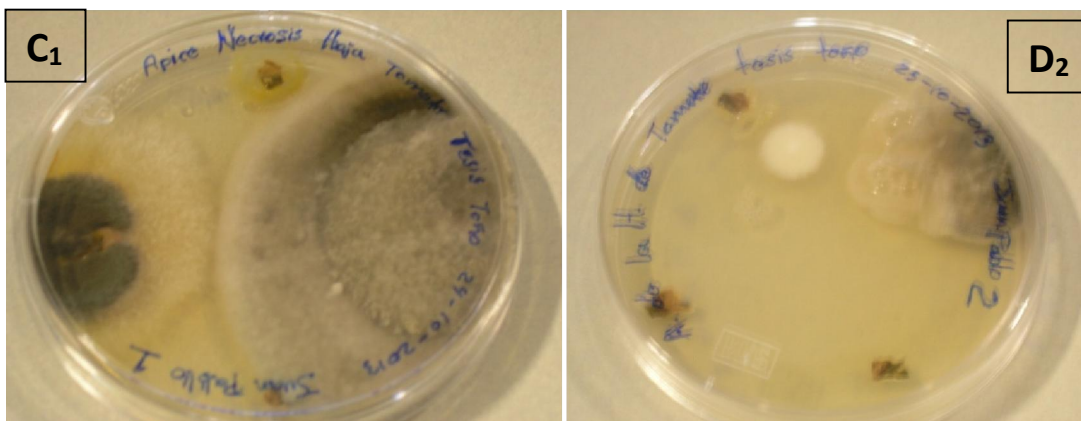
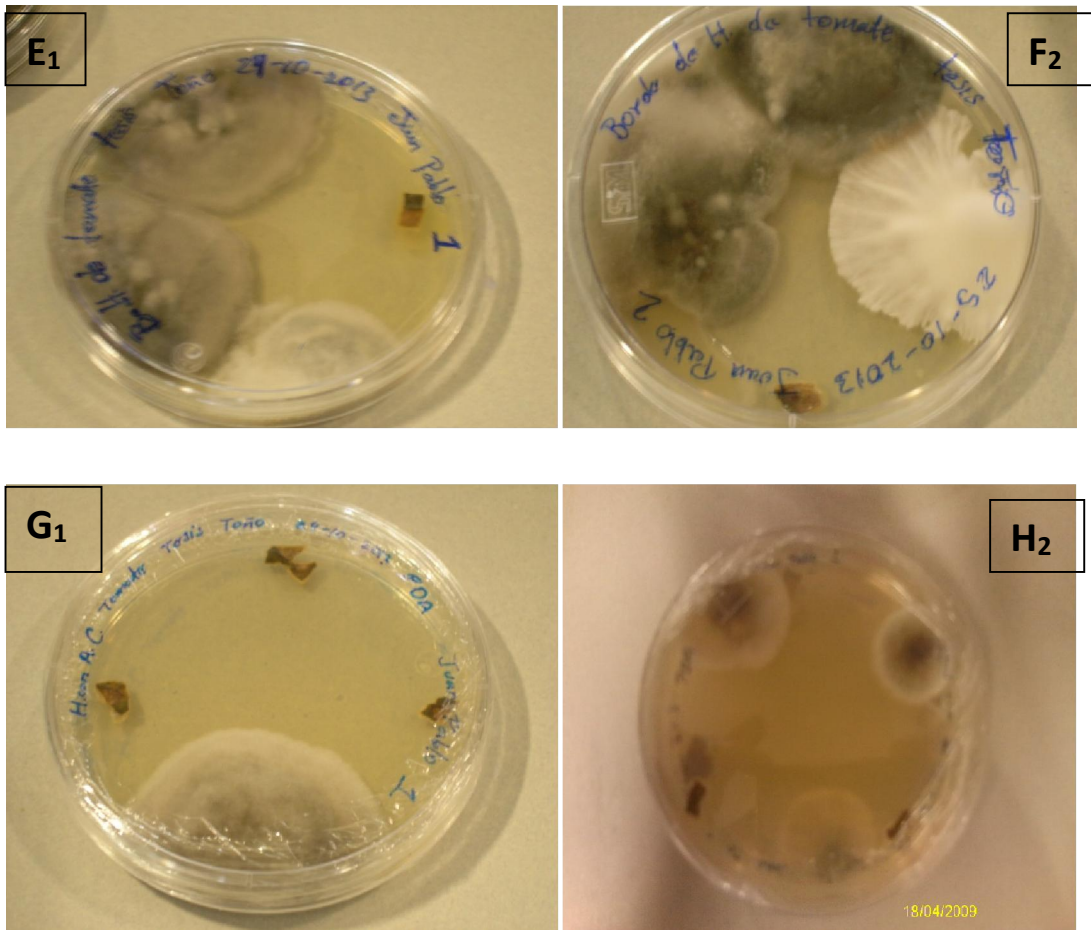


Figura 2. Diferentes coloraciones en los tres tipos lesiones (ápice (C1 y D2), borde (E1 y F2) y en las partes céntricas (G1 y H2) de la hoja de tomate).



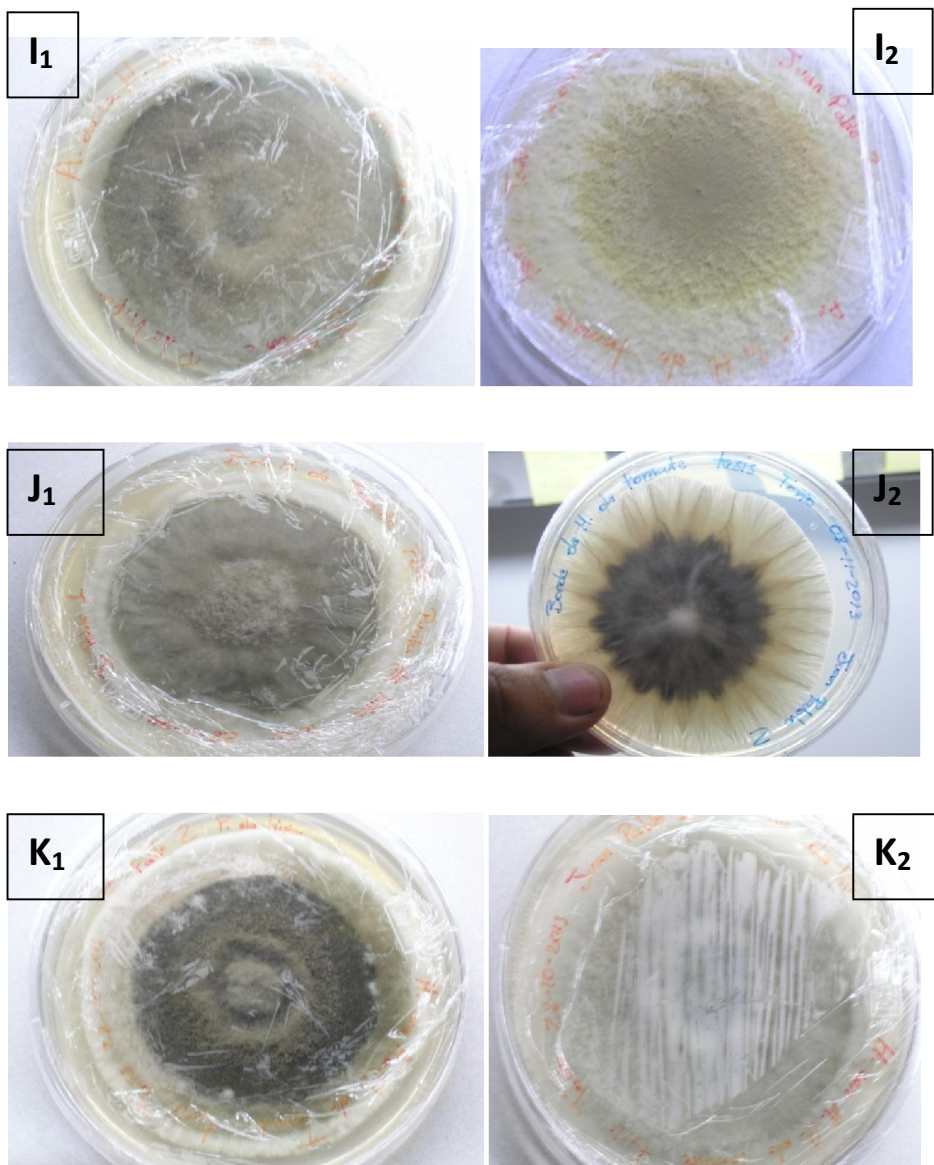


4.2.- Etapa experimental 2: Aislamiento de los patógenos

4.2.1.- Incremento del inoculo por siembra directa

Los resultados de las colonias de hongos al paso de los días se observaron crecimientos iguales en las 6 cajas que ilustran la figura 2, observando coloraciones verde-oscuro casi gris con abundante micelio, típico de *Alternaria solani*, a continuación en la figura 3, se observan cepas de los patógenos aislados.

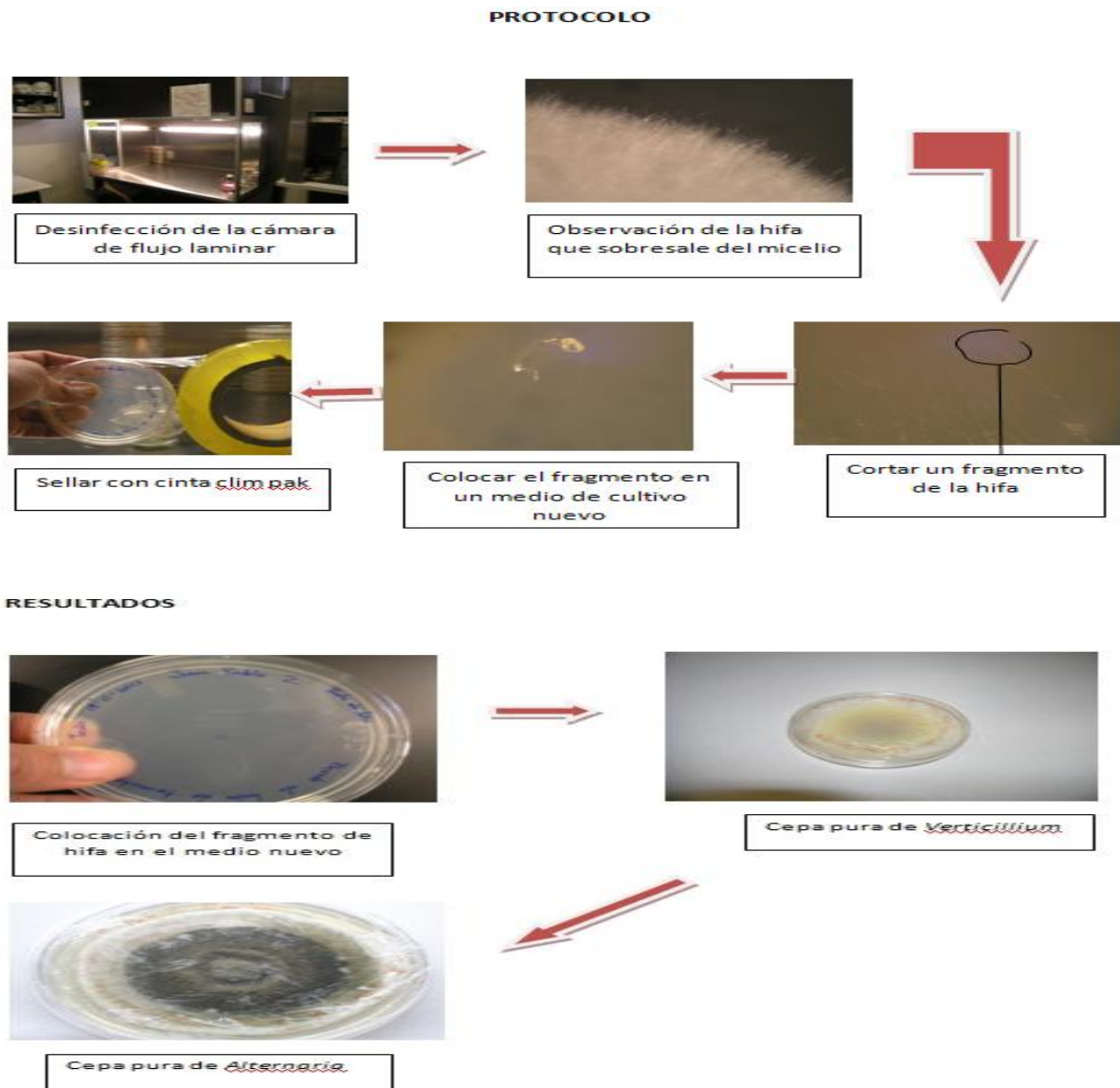
Figura 3. Cepas de los patógenos aislados en los tres tipos lesiones (ápice (I1 y I2), borde (J1 y J2) y en las partes céntricas (K1 y K2) de la hoja de tomate teniendo en cuenta que 1 (Juan Pablo1) y 2 (Juan Pablo 2).



4.2.2.- Aislamiento por punta de hifa

Los resultados obtenidos mediante el aislamiento se puede observar en la figura 4, donde muestra el protocolo de purificación por medio de punta de hija hasta obtener un patógeno puro sin contaminantes y así sucesivamente se realizó para cada muestra.

Figura 4. Protocolo para purificación de patógenos por punta de hifa



4.3.- Etapa experimental 3: Identificación de las especies de hongos presentes en las muestras de hojas de Tomate

A partir de las dos muestras de tomate variedad Juan Pablo provenientes de Tula Tamaulipas una las zonas productoras de tomate en México se logró identificar dos géneros de hongos *Alternaria spp.*, y *Verticillium spp.*, la caracterización se realizó en base a las características morfológicas de cada género.

En el caso de *Alternaria spp.*, se observó la producción de conidióforos con cadena de conidios, los conidióforos oscuros, en su mayoría simples, cortos o alargados por lo general llevan una cadena simple de conidios; los conidios son café oscuro, por lo general con septos longitudinales y transversales. Este género se presentó en todas las muestras de las lesiones (en el ápice, borde y en las partes céntricas de la hoja), para las dos muestras (Juan Pablo 1 y 2).

Carrillo (2004), menciona que los conidios de *Alternaria* tienen septos transversales y longitudinales y se les conoce como dictiosporas, además son pardos y picudos. Nacen por la brotación apical de una célula conidiógena o de la espora anterior, dando lugar a una cadena que puede ramificarse si una espora produce más de un brote. Por su parte, García *et al.* (2013), menciona que las colonias de *Alternaria* en las lesiones de las hojas presentaron cadenas largas de conidios con coloración café clara, la coloración de las colonias son negras con crecimientos en forma de anillos concéntricos y esporulación abundante a los 6 días de incubación.

Los conidióforos que contienen una sola espora son producidos individualmente o en pequeños grupos. La luz y las temperaturas entre 19 y 23 °C, estimulan el desarrollo de los conidióforos (Zachmann, 1982).

Figura 5. Morfología de aislamiento de *Alternaria spp.*, de hojas de tomate en Lactofenol azul; imagen L (conidio septado), imagen M (conidióforo) e imagen N (cadena de conidios).

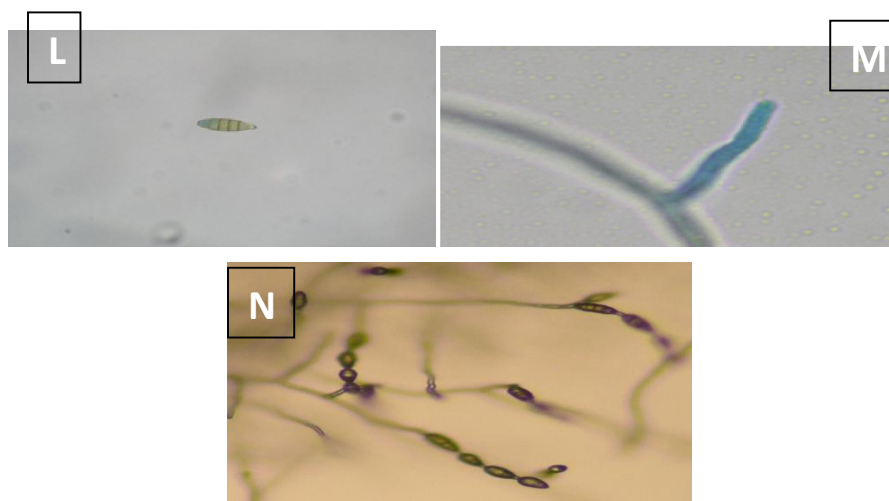
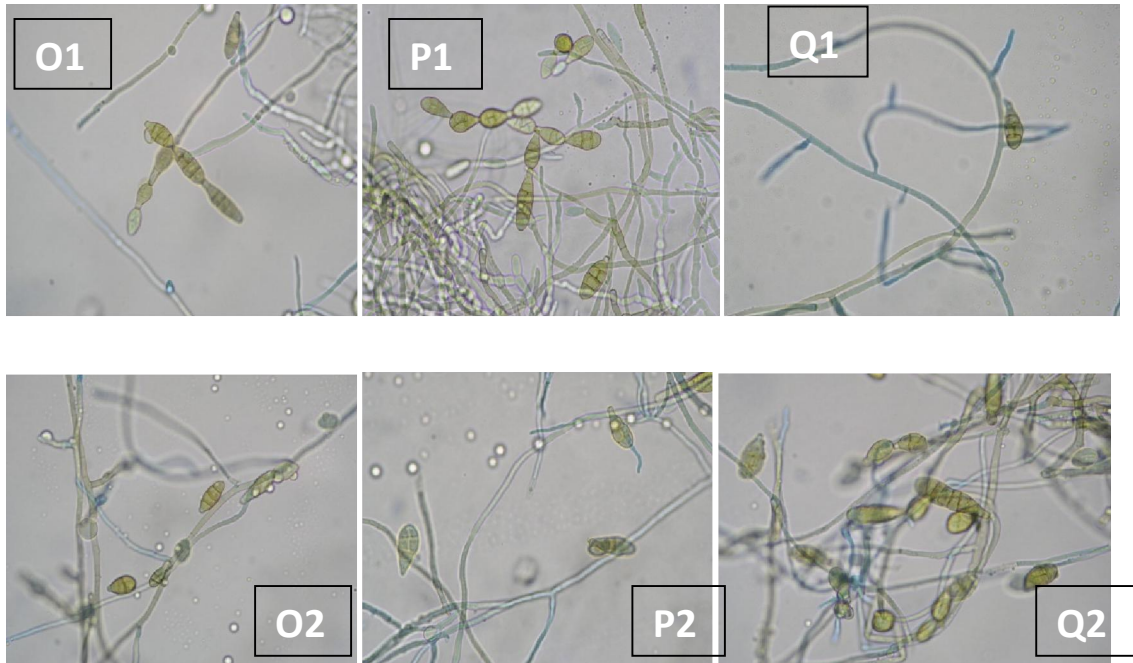


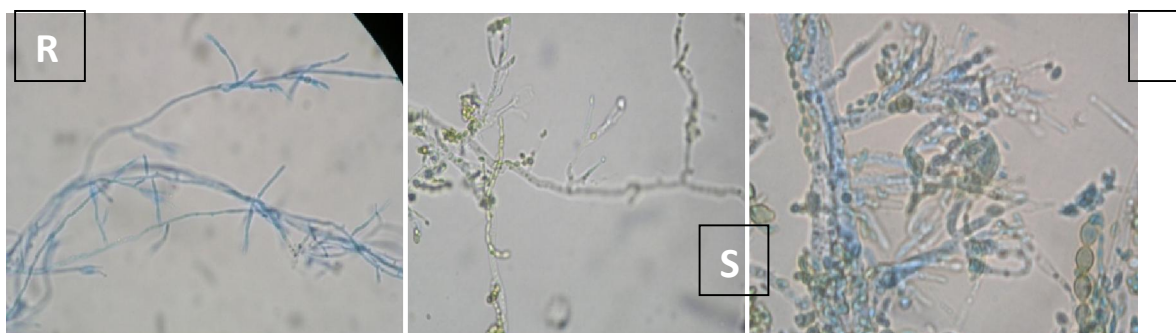
Figura 6. Morfología de aislamiento de *Alternaria spp.*, en los tres tipos lesiones (ápice (O1 y O2), borde (P1 y P2) y en las partes céntricas (Q1 y Q2) de la hoja de tomate teniendo en cuenta que 1 (Juan Pablo1) y 2 (Juan Pablo 2).



En el caso de *Verticillium spp.*, se observó los conidióforos delgados, ramificados en forma verticilada (Imagen R), la conidia es hialina unicelular, ovoide a elipsoide y nace sola o en pequeños grupos (Imágenes S y T). Rubilar (2010), menciona que las hifas pueden estar melanizadas, ausencia de microesclerocios y presencia de colonias de color que varían de blanco a gris, conidióforos verticilados, con 3 a 4 fialidas de tamaño promedio de 30, 10 x 2, 26 μm y una longitud promedio de 60 μm aproximadamente por conidióforo. En las hojas de la muestra 2 de tomate variedad (Juan Pablo), se observaron síntomas de necrosis en forma de “V” del ápice hacia la nervadura principal de la hoja, así como también del borde hacia la nervadura principal.

Verticillium spp., es un hongo de suelo que produce enfermedades denominadas Verticilosis, responsables de importantes pérdidas en una amplia gama de especies cultivadas entre las que destacan algodón, cultivos hortícolas y olivo (Escudero *et al.*, 2003). Actualmente son pocas las asociaciones a este cultivo por lo que no es muy común esta enfermedad. Por su parte Nieto en (1989), mencionó que los síntomas que *Verticillium* ocasiona en papa cambian tanto como las condiciones climáticas; Bajo condiciones frías y húmedas no hay signos de marchitez, solo se presenta un amarillamiento progresivo de las hojas; en condiciones climáticas moderadas los síntomas se presentan después de la floración; durante los días más calurosos comienzan por una ligera flacidez o caída de las puntas de los folíolos.

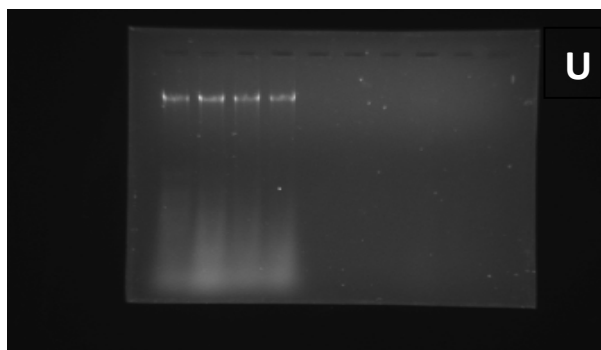
Figura 7. Morfología de aislamiento de *Verticillium spp.*, en la lesión de Ápice de la hoja de tomate variedad (Juan Pablo) encontrándose únicamente en la muestra 2.



4.4.- Etapa experimental 4: Identificación molecular por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

De la extracción de ADN, se realizó una electroforesis en gel de Agarosa al 1% teñido con bromuro, para observar la presencia de bandas de ADN, la cual podemos visualizar en la siguiente imagen:

Figura 8. Presencia de bandas de ADN, producto de la extracción.



Ochoa *et al.* (2012), realizó la visualización del ADN en un gel de agarosa al 1% mediante electroforesis, por su parte, Allende *et al.* (2012), verifica la integridad del ADN mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro.

4.4.1.- Espectrofotometría

Una vez que se corroboró la presencia de bandas de ADN, se realizó una espectrofotometría para cuantificar la concentración de ADN, misma que se midió mediante la absorbancia 260 y 280 nm de longitud de onda, los resultados se muestran en el siguiente cuadro:

Cuadro 7. Concentración de ADN, medidos en un espectrofotómetro.

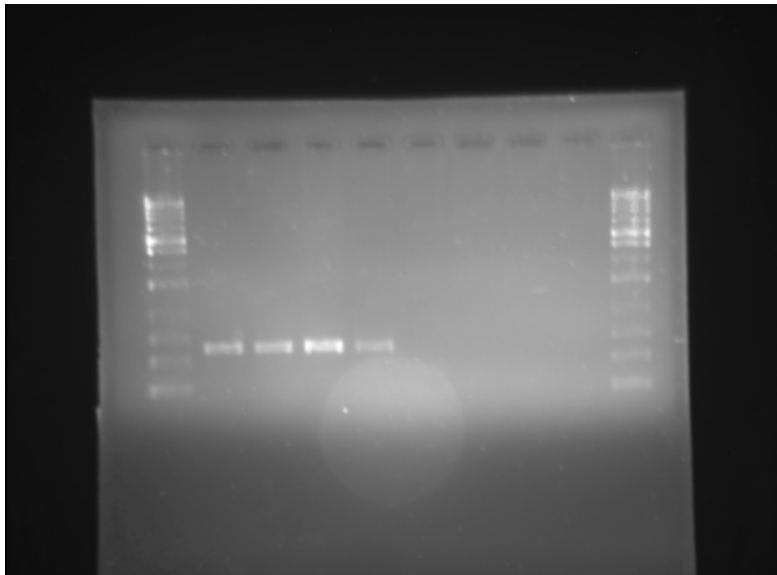
Muestra	Absorbancia 260	Absorbancia 280	Resultado
V1	0.298	0.291	1.024
V2	0.242	0.203	1.192
V3	0.175	0.155	1.129
V4	0.163	0.144	1.132
D1	0.084	0.078	1.077
D2	0.076	0.070	1.086
D3	0.067	0.064	1.047
D4	0.084	0.077	1.091

Allende (2012), determina que la cantidad y calidad de ADN, extraído se mide la absorbancia 260 y 280 nm de longitud de onda en un biofotómetro 6131 Eppendorf.

4.4.2.- Amplificación de ADN

La amplificación del ADN se realizó por el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), las regiones internas transcritas ITS1 e ITS4 entre los genes ribosomales (rDNA) 18S-5.8S y 5.8S-28S utilizando el par de iniciadores de secuencia ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG)/ ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC). Realizando la electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro obteniendo como resultado la tinción de bandas amplificadas que se pueden visualizar en la siguiente imagen:

Figura 9. Presencia de bandas amplificadas de ADN, producto de la PCR.



Nótese que dichas bandas tienen una alineación de manera uniforme entre 500 y 600 pb (pares de bases), posteriormente el resultado de la purificación de bandas amplificadas se envió secuenciar.

4.4.3.- Secuenciación de las muestras de ADN producto de la PCR

En las dos direcciones secuenciadas por muestra tuvieron un 100% de similitud entre nucleótidos (Cuadro 8). Al comparar la secuencia de nucleótidos de cada aislamiento identificado morfológicamente en este trabajo con las reportadas en el banco de genes del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Apéndice), éstas correspondieron a la misma especie, con el más alto valor de identidad, con lo cual se corroboró la identidad morfológica de las especies aisladas.

Cuadro 8. Comparación molecular por alineamiento de las secuencias reportadas en el banco de genes con las secuencias intergénicas (ITS)¹ de los genes rDNA de las especies de hongos aisladas de hojas de tomate.

Nombre de la muestra ²	Especie identificada	Número de nucleótidos ³	Número de acceso ⁴	IS ⁵
V ₁	<i>Verticillium dahliae</i>	490	DB080520009-3	100%
D ₁	<i>Alternaria solani</i>	557	CBS111.44	100%

¹Internal transcribed spacer (siglas en ingles), ²Nombre que recibe la muestra analizada, ³Numero de nucleótidos amplificados por PCR: ITS con los iniciadores ITS1-ITS4, ⁴Base de datos del NCBI (Nacional Center of Biotechnology Information), ⁵Indice de similitud entre las secuencias de las especies aisladas y las especies comparadas.

V.- CONCLUSIÓN

Los fitopatógenos presentes en las muestras de tomate (Juan Pablo) en Tula, Tamaulipas México, fueron; *Alternaria spp.*, la cual se presentó en todas las muestras seleccionadas para la determinación de los patógenos, comparando por medio de morfología (Figura 6), se definió el género *Alternaria spp.*, y corroborando con los resultados de las secuencias (Apéndice), con un 100% de similaridad se obtuvo como resultado *Alternaria solani*.

Otro género fue *Verticillium spp.*, el cual solo se presentó en la muestra 2 (Juan Pablo 2), que de igual forma se comprobó por medio de morfología (Figura 7), definiendo el género *Verticillium spp.*, posteriormente con el resultado de las secuencias (Apéndice), con un 100% de índice de similaridad se identificó a *Verticillium dahliae*.

VI.- LITERATURA CITADA

Allende et al., 2012. Identificación morfológica y molecular de *Penicillium oxalicum* causante de la pudrición de tallos y frutos de tomate. Revista Mexicana de Micología.

Anónimo, 2010. Manejo integrado de enfermedades del tomate. Universidad de Chile. Pág. 44 – 50.

Argerich C. y Gaviola J.C., 2002. Manual de producción de semillas hortícolas. Tomate. Pág. 4.

Barnett H.L. y Hunter Barry B., 1972. Illustrated general of imperfect fungi. Printed in the United States of America.

Brandan A. E. Z., Gonzales A. G. y Seco E., 2009. Tomate destinado a la industria.

Braun, U., R. T. A. Cook, A. J. Inman y H. D. Shin. 2002. The taxonomy of powdery mildew fungi. Pp. 55. *In: The powdery mildews. A comprehensive treatise.* Bélanger, R. R., W. R. Bushnell, A. J. Dik and T. L. W. Carver (eds). APS Press. St. Paul, Minnesota.

Carrillo L., 2004. Los hongos de los alimentos y forrajes. *Alternaria.* Pág. 81-83.

Carrillo F., Montoya R. T. J., García E. J., 2003. Razas de *F. oxysporum* f. sp. *Lycopersici* en tomate. Pág. 125- 130. Revista Mexicana de Fitopatología.

Castro I. y Contreras A., 2011. Manejo de plagas y enfermedades del cultivo de la papa. Imprenta Austral, Valdivia-Chile 72 páginas.

Cronquist A., 1984. Introducción a la botánica. 2ad. Ed. CECSA. México. 848 p.

De la Cruz A., 2014. Con el precio por los suelos aquí, el tomate de Tamaulipas invade EUA gracias a nevadas. Gaceta Tamaulipas.

De Souza, V. L., y A. C. Café-Filho, 2003. Resistance to *Leveillula taurica* in the genus *Capsicum*. Plant Pathology 52: 613-619.

Escudero L. F. J., Núñez S. D. y Blanco L.M. A., 2003. Aislamiento de *Verticillium dahliae* de suelo y caracterización morfológica de sus microesclerocios.

Esquinas J. T. y Nuez V. F., 1995. El cultivo del tomate. Ediciones Mundi-Prensa, España, 793 p.

FAO, 2011. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.

García L. E., Leyva M. J, Villaseñor H. S., Rodríguez G. F., Tovar P. M., 2013. Identificación e incidencia de tres hongos fitopatógenos, de reporte nuevo en avena en la meseta central de México.

Guzman-Plazola, R. A., R. M. Davies S., J. J. Marois, 2003. Effects of relative humidity and high temperature on spore germination and development of tomato powdery mildew (*Leveillula taurica*). Crop Protection 22: 1157-1168.

Jones, J. B; Stall, R. E y Zitter, T. A. 2001. Plagas y enfermedades del tomate. Ed. Mundi-Prensa. The American Phytopathological Society. México D. F. 74 p.

Lesur, H. G., 2006. Etapas fenológicas del cultivo del Tomate *Lycopersicon sculentum* L.

Lorena I. y Melgarejo P., 2009. Development of a method for detection of the biocontrol agent *Penicillium oxalicum* in Korea Plant Pathology Journal 24:87-89.

López-Escudero J., D. Núñez-Santos, M. A. Blanco-López. Departamento de Agronomía, ETSIAM, Universidad de Córdoba. Apdo. 3048, 14080 Córdoba.

Mazzanti de Castañon, M.A.; Cundom, M.A.; Cabrera de Álvarez, M.G. 2010. Enfermedades en cultivos protegidos de tomate, pimiento y berenjena, en el nordeste argentino. Hort. Arg. 13(34-35): 1-8. may.-dic. 2010. Página/s: 8. Hospedero: Tomate - Referencia: 347.

Mendoza P., 2013. Red provisional de precios pagados a productor informes por producto Tomate.

Mendoza Z. C., 1992. Enfermedades fungosas de hortalizas y fresa. Pp 273-312 En: Manejo Fitosanitario de las Hortalizas en México. Anaya R., S., N. Bautista M., B. Domínguez R. (eds). Centro de Entomología y Acarología. Chapingo, México. Colegio de Postgraduados-Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos.

Mendoza, Z. C. 1996. Enfermedades fungosas de las hortalizas. Universidad Autónoma Chapingo. Depto. de Parasitología Agrícola. Chapingo, México. 83 p.

Mendoza Z. C., Pinto D. E., 1983-1985. Síntomas y daños ocasionados por enfermedades fungosas.

Ministry of Agriculture y Lansd, 2004. Management of powdery mildew, *Leveillula taurica*, in greenhouse peppers. Crop Protection Factsheet. British Columbia, USA.

Mónaco C., Nico A., Rollan M., Urrutia M., 2001. Efecto <<in vitro>> de dos fungicidas sobre la microflora antagonista al tizón temprano del tomate. Pag. 326-327.

Moreña J. J., Rodríguez V. P., Guzmán A. M. y Zapata M. A., 2006. El cultivo del tomate bajo invernadero. Boletín técnico 21. Centro de investigación la selva Rionegro, Antioquia, Colombia.

Nicot P. C., M. Bardin, A. J. Dink, 2002. Basic methods for epidemiological studies of powdery mildews: culture and preservation of isolates, production and delivery of

inoculum, and disease assessment. Pp. 83-99. *In: The Powdery mildews. A comprehensive treatise.* Bélanger, R. R., W. R. Bushnell, A. J. Dik and T. L. W. Carver (eds). APS Press. St. Paul, Minnesota.

Nieto P. L. E., 1989. Enfermedades de la papa causada por hongos: *Verticillium*, *Fusarium*, *Rizoctonia* y *Puccinia*. Pag. 89-90-91.

Nuez F., 1999. Desarrollo de nuevos cultivares. Pag. 669. El cultivo del tomate. Edición Mindi-Prensa, España. 793 p.

Ochoa F. Y.et al.,2012. Identificación de especies de *Fusarium* en semilla de ajo em Aguascalientes, México.

Peralta I., S. Knapp, y D.M. Spooner, 2005. New species of wild tomatoes (*Solanum* section *Lycopersicon*: Solanaceae) from northern Peru. Syst. Bot. 30:424-434.

Polack, A. y Mitidieri, M. 2002. Producción de tomate diferenciado. Protocolo preliminar de manejo integrado de plagas y enfermedades. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA); Estación Experimental Agropecuaria

Ramírez M. M., 2014. Toro F1, híbrido tipo saladette de alta productividad para la planicie huasteca. Campo experimental Sur de Tamaulipas, Tampico-Mante. Pag. 89-90.

Reuveni R., M. Perl, J. Rotem, 1974. The effect of *Leveillula taurica* on leaf abscissions in peppers. Phytopathol. 80: 79-84.

Rodríguez L. G., 1984. Enfermedades causadas por hongos que viven en el suelo.

Rubilar R. M. A., 2010. Estudios de patogenicidad y detección mediante PCR de *Verticillium albo-atrum* en kiwi. Facultad de ciencias agronómicas Universidad de Chile.

Sánchez C. M., 1980. Manejo de enfermedades del tomate. Curso del INCAPA "Manejo integrado de enfermedades en Tomate, Chile y Papa".

Sánchez C., M. A. 1983. La cenicilla del tomate causada por *Oidiopsis taurica* (Lev) Salmon: Una nueva enfermedad en el estado de Sinaloa, México. Revista Mexicana de Fitopatología 2: 3-6.

Smith J. L., 1987. El cultivo del Tomate en México.

SIAP, 2012.Elaborado por el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), con información de las Delegaciones de la SAGARPA.

SIACON, 2010. Sistema de Información Agroalimentaria de Consulta.

Valadez F. R., 1989. Morfología y etapas fenológicas del cultivo del Tomate.

Valenzuela, J. G. 2004. Manejo de enfermedades en hortalizas bajo invernadero. In: Manual de producción hortícola en invernadero. 2ª Ed. INTAGRI. Celaya, Gto. México. pp 318-344.

Velázquez-Valle, R. y M. M. Media-Aguilar, 2005. Identificación de variables de clima relacionadas con cenicilla polvorienta (*Oidiopsis* spp.) de chile en Aguascalientes y Zacatecas. Segunda Convención Mundial del Chile. Pepper Diseases. Pp. 44-48.

Velázquez-Valle, R., y Valle-Garcia P. 1999. First report of powdery mildew of pepper in North-Central Mexico. Plant Disease 83: 302. Scientific Note.

Zachmann R., 1982. Tizón temprano de la papa. Boletín de información. Lima Peru.

VII.- APÉNDICE

Verticillium dahliae

Verticillium dahliae isolate >gi|240129530|gb|GQ149479.1| *Verticillium dahliae* isolate DB 08052009-3 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 4, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

```
TTTGTGAACCATATTGTTGCTTCGGCGGCTCGTTCTGCGAGCCCGCCGGTCCATCAGTCTCTCTGTTTAT
ACCAACGATACTTCTGAGTGTCTTAGCGAACTATTAACACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGCTCTAGCA
TCGATGAAGAACGCAGCGAAACCGGATATGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTG
AACGCACATGGCGCCTTCCAGTATCCTGGGAGGCATGCCTGTCCGAGCGTCGTTTCAACCCTCGAGCCCC
AGTGGCCCGGTGTTGGGGATCTACGTCTGTAGGCCCTTAAAAGCAGTGGCGGACCCGCGTGGCCCTTCAT
TGCGTAATAGTTACAGCTCGCATCGGAGTCCCGGAGGCGCTTGCCTCTAAACCCCTACAAGCCCGCCTC
GTGCGGCAACGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATAT
```

Alternaria solani

Alternaria solani rRNA genes and ITS1 and ITS4 DNA, isolate CBS 111.44 >gi|3688152|emb|Y17070.1| *Alternaria solani* rRNA genes and ITS1 and ITS2 DNA, isolate CBS 111.44

```
CACAAATATGAAGGCGGGCTGGCACCTCCCGGGGTGGCCAGCCTTGCTGAATTATTCCACCCGTGTCTTT
TGCGTACTTCTTTGTTTCCTTGGTGGGCTCGCCACCACAAGGACCAACCCATAAACCTTTTTGCAATGGC
AATCAGCGTCAGTAACAATGTAATAATTTACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGA
AGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC
ATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGCGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCCTCAAGCTTTGCTTGGT
GTTGGGCGTCTTTTTGTCTCCCTTTCGCGGAGACTCGCCTTAAAGTCATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTT
CGGAGCGCAGCACAAGTCGCGCTCTCTTCCAGCCCCAAGGTCTAGCATCCACCAAGCCTTTTTTTTCAAC
TTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGC
```