

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

**DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL**

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LA
ROYA DE *Rubus* sp. SILVESTRE Y SUS HIPERPARÁSITOS
EN HIDALGO Y PUEBLA**

T E S I S

Que como Requisito Parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

P R E S E N T A

ERIDA YASMIN LÓPEZ VÁSQUEZ

Bajo la supervision de: **DR. DIMAS MEJÍA SÁNCHEZ**



Chapingo, Estado de México, junio de 2022

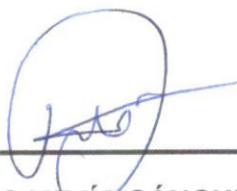


**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LA ROYA DE
Rubus sp. SILVESTRE Y SUS HIPERPARÁSITOS EN HIDALGO Y PUEBLA**

Tesis realizada por **Erida Yasmin López Vásquez** bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

DIRECTOR:



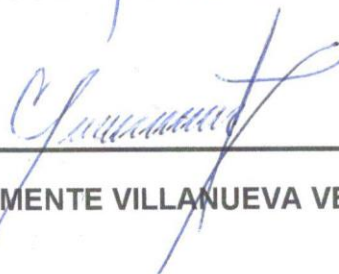
DR. DIMAS MEJÍA SÁNCHEZ

ASESOR:



DR. MIGUEL ÁNGEL SERRATO CRUZ

ASESOR:



DR. CLEMENTE VILLANUEVA VERDUZCO

CONTENIDO

RESUMEN GENERAL	IX
ABSTRACT.....	X
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVO GENERAL	2
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	2
LITERATURA CITADA	3
CAPITULO I. ENFERMEDADES FUNGOSAS DE LA ZARZAMORA	4
1.1. CULTIVO DE ZARZAMORA.....	4
1.1.1. Descripción e importancia	4
1.1.2. Clasificación taxonómica.....	5
1.1.3. Enfermedades fungosas de la Zarzamora	6
1.1.4. Royas en cultivos de Zarzamora.....	8
1.2. ANTECEDENTES DE HIPERPARÁSITOS EN ROYAS.....	13
1.3. LITERATURA CITADA	15
CAPITULO II. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LAS ROYAS EN <i>Rubus</i> sp. SILVESTRE DE HIDALGO Y PUEBLA	19
2.1. RESUMEN.....	19
2.2. ABSTRACT.....	20
2.3. INTRODUCCIÓN	21
2.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
2.4.1. Área de muestreo del material biológico	22
2.4.2. Caracterización morfológica de la roya	23
2.4.3. Identificación molecular de la roya	24
2.5. RESULTADOS	26
2.5.1. Caracterización morfológica de la roya	27
2.5.2. Identificación molecular de la roya	29

2.6. DISCUSIÓN.....	30
2.7. CONCLUSIÓN.....	31
2.8. LITERATURA CITADA	32
CAPITULO III. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LOS	
HIPERPARÁSITOS DE LAS ROYAS DE <i>Rubus</i> sp. SILVESTRE EN	
LOCALIDADES DE HIDALGO Y PUEBLA	34
3.1. RESUMEN.....	34
3.2. ABSTRACT.....	35
3.3. INTRODUCCIÓN	36
3.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
3.4.1. Aislamientos de hiperparásitos de la roya.....	37
3.4.2. Purificación y resguardo de las cepas.....	37
3.4.3. Caracterización morfológica del hiperparásito	37
3.4.4. Identificación molecular del hiperparásito	38
3.5. RESULTADOS	40
3.5.1. Hiperparásitos sobre pústulas de roya.....	40
3.5.2. Caracterización morfológica de las cepas de hiperparásito	42
3.5.3. Identificación molecular del hiperparásito	43
3.6. DISCUSIÓN.....	44
3.7. CONCLUSIÓN.....	47
3.8. LITERATURA CITADA	48
DISCUSIÓN GENERAL.....	50
CONCLUSIONES GENERALES	51
RECOMENDACIONES.....	51

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Referencia geográfica de los sitios muestreados	23
Cuadro 2. Reactivos utilizados en un tubo Eppendorf de 1.5 mL para una reacción	25
Cuadro 3. Reactivos y concentraciones utilizadas en una reacción de PCR para cepas de hiperparásito.....	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Síntomas de roya en plantas de zarzamora..	11
Figura 2. Plantas de zarzamora con roya.	13
Figura 3. Sitios muestreados. Hidalgo y Puebla	22
Figura 4. Plantas de zarzamora silvestre con síntomas de roya en hoja.	26
Figura 5. Pústulas (A) y soros (B) de roya en hojas de zarzamora.....	27
Figura 6. Soro con uredosporas (A) y uredosporas con pedicelos (B),.....	28
Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa de ITS 1 y 4, DNA de roya.....	29
Figura 8. Análisis filogenético de ITS de la roya.	30
Figura 9. Hiperparásito sobre una pústula de roya.	41
Figura 10. Cortes de tejido de hoja de zarzamora con roya e hiperparásito.....	41
Figura 11. Colonia del aislamiento HRZB41 y HRZA18	42
Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa de ITS 1 y 4. Muestra HRZB41 y HRZA18.	43
Figura 13. Análisis filogenético de ITS de hiperparásitos.	44

DEDICATORIAS

A mis papas, Florencia y Félix por su cariño y motivación en mi crecimiento profesional.

A mi esposo Silverio, por su amor, motivación y apoyo incondicional en mi formación académica.

A mis hermanos Deolegario, Ana, Cristina y Jesús por su cariño y amistad.

A mis abuelas Emilia y Bernadina por su cariño y por inculcarme valores que conservo en mi formación profesional y personal.

A mi pequeña Valentina por su cariño y por esos momentos especiales que me comparte.

A mi familia, a cada una de esas personas que forman parte importante de mi vida personal y académica.

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por otorgar apoyo económico a estudiantes de posgrado.

A la **Universidad Autónoma Chapingo** por brindarme la oportunidad de formarme como Maestro en Ciencias y por las facilidades para el desarrollo del presente proyecto de investigación.

A los Programas Nacionales Estratégicos (**PRONACES**), principalmente a la Soberanía Alimentaria y a la conservación del Medio Ambiente.

A la Coordinación de la Maestría en Protección Vegetal, especialmente al **M.C. Antonio Segura Miranda** por el apoyo brindado durante la maestría.

Al **Dr. Roney Solano Vidal** por proyectar y compartir la idea del tema de investigación, por su apoyo durante las colectas y trabajo en laboratorio, por sus comentarios y sugerencias durante la elaboración del documento de tesis.

Al **Dr. Dimas Mejía Sánchez, Dr. Miguel Ángel Serrato Cruz y Dr. Clemente Villanueva Verduzco** por formar parte del comité asesor y por sus valiosas aportaciones en la presente tesis.

DATOS BIOGRÁFICOS



Erida Yasmin López Vásquez nació en San Juan Tonaltepec, municipio de Santiago Nacaltepec, Oaxaca el 20 de octubre de 1992. Realizó sus estudios básicos en San Juan Tonaltepec. En 2008 ingresó a la preparatoria agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo y en 2015 se graduó como Ingeniero Agrónomo Especialista en Fitotecnia en la misma institución. En octubre de 2016 presentó su examen profesional con la tesis “Caracterización *in vitro* del agente causal de la marchitez en Higuierilla (*Ricinus communis* L.)”. En 2017 participo en el programa de Extensionismo en la cadena productiva de maíz. Trabajó realizando actividades de diagnóstico y apoyo a la investigación del proyecto “Caracterización de razas fisiológicas de *Hemileia vastatrix* como alternativa para el manejo fitosanitario de la roya del cafeto en México”. Al mismo tiempo asesoró a estudiantes en sus evaluaciones *in vitro* de fitotoxicidad de aceites vegetales y extractos acuosos contra hongos fitopatógenos. En 2020 ingreso a la Maestría en Protección Vegetal de la Universidad Autónoma Chapingo. Participa como autor en el artículo “Evaluación *in vitro* de métodos contra *Botrytis cinérea*” y en el capítulo “Evaluación *In Vitro* de Aceites Esenciales y preparados Homeopáticos en el crecimiento de algunos Hongos Fitopatógenos” del libro La Homeopatía Hoy.

RESUMEN GENERAL

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LA ROYA DE *Rubus* sp. SILVESTRE Y SUS HIPERPARÁSITOS EN HIDALGO Y PUEBLA

En zonas silvestres de los estados Puebla e Hidalgo se observaron plantas de zarzamora (*Rubus* sp.) con síntomas de roya. Se colectaron muestras representativas y se almacenaron en frío. Los síntomas y signos se observaron en el haz y envés de las hojas y con menor frecuencia en tallos. Sobre las pústulas de roya de las hojas se observaron crecimientos de un hiperparásito y se aislaron en medio de cultivo PDA para su identificación y caracterización. Para confirmar la identidad de la roya y de las cepas de hiperparásitos, se realizó una secuenciación directa de la región ITS 2. Los resultados de la investigación determinaron que la muestra secuenciada de roya compartió 85% de identidad con *Kuehneola uredinis*, además se detectó la presencia de dos especies de la familia *Didymellaceae* como hiperparásitos asociados a la roya de zarzamora, la muestra HRZB41 presentó un porcentaje de identidad de 100% con *Boeremia exigua* var. *exigua* y la muestra HRZA18 presentó 99.61% de identidad con *Didymella glomerata*. De acuerdo con nuestro conocimiento este sería el primer reporte de la identificación de la roya de *Rubus* sp. silvestre en México y de sus hiperparásitos asociados.

Palabras clave: *Rubus* sp., *Kuehneola uredinis*, hiperparásito, *Didymellaceae*, *Boeremia exigua* var. *exigua*, *Didymella glomerata*.

Tesis de Maestría en Ciencias en Protección Vegetal, Universidad Autónoma Chapingo

Autor: Erida Yasmin López Vásquez

Director de Tesis: Dr. Dimas Mejía Sánchez

ABSTRACT

MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF THE RUST OF *Rubus* sp. SYLVAN AND ITS HYPERPARASITES IN HIDALGO AND PUEBLA

Blackberry plants (*Rubus* sp.) with rust symptoms were observed in sylvan areas of Puebla and Hidalgo states. Representative samples were collected and stored cold. The symptoms and signs were observed on the upper and underside sides of leaves and less frequently on stems. Growths of a hyperparasite were observed on the leaf rust pustules and they were isolated in a PDA crop medium for identification and characterization. To confirm the identity of the rust and hyperparasite strains, direct sequencing of the ITS 2 region was performed. The results of the investigation determined that the sequenced rust sample shared 85% identity with *Kuehneola uredinis*. In addition, the presence of two species of the *Didymellaceae* family as hyperparasites associated with blackberry rust was detected, the sample HRZB41 presented a 100% identity percentage with *Boeremia exigua* var. *exigua* and the HRZA18 sample presented 99.61% identity with *Didymella glomerata*. To the best of our knowledge, this would be the first report of the identification of *Rubus* sp. sylvan in Mexico and its associated hyperparasites.

Keywords: *Rubus* sp., *Kuehneola uredinis*, hyperparasite, *Didymellaceae*, *Boeremia exigua* var. *exigua*, *Didymella glomerata*.

Tesis, Universidad Autónoma Chapingo

Author: Erida Yasmin López Vásquez

Advisor: Dr. Dimas Mejía Sánchez

INTRODUCCIÓN

La zarzamora pertenece al género *Rubus* de la familia Rosácea y forma parte del grupo de las “berries” que se caracterizan por su alto valor nutritivo y comercial. Debido a sus características nutricionales es una de las frutillas con mayor producción y comercialización a nivel mundial (Muratalla-Lúa *et al.*, 2013; Ricárdez *et al.*, 2016).

En el año 2021 la producción de zarzamoras en México fue de 212 316 t, destacando el Estado de Michoacán con una superficie sembrada de 8 418 ha que representa el 88 % de la superficie total, seguido por Jalisco con 8.5 % (SIAP, 2022).

El cultivo de zarzamora es atacado por varias especies de roya con amplia distribución mundial, algunos son: *Kuehneola uredinis* (Enlace) Arthur (Rodrigues *et al.*, 2021), *Gerwasia lagerheimii* (Magnus) Buriticá (Díaz *et al.*, 2011), *Arthuriomyces peckianus* (Howe) Cummins e Y. Hiratsuka (Sherri y Terrence, 2008), *Phragmidium violaceum* (Schultz) Winter (Menéndez, 2007), *Pucciniastrum americanum* (Farl.) Arth. (Rebollar *et al.*, 2001) y *Kuehneola loesneriana* Arth. (López y García, 2001). Las royas constituyen uno de los principales problemas para la producción y exportación de frutos, la cual afecta el follaje y reduce la calidad de los frutos (Rebollar *et al.*, 2001; Sherri y Terrence, 2008; Fact sheet, 2013).

Una alternativa viable pero poco estudiada, para enfrentar el problema señalado, es el combate de esta enfermedad con agentes biológicos. Para lograrlo de forma eficiente, primero es necesario conocer e identificar organismos autóctonos de las zonas de producción, con potencial para actuar como controladores (Holst *et al.*, 2017). Un estudio por Ashmitha *et al.* (2019) muestra, mediante micrografías electrónicas de barrido, el enrollamiento y perforación de uredosporas de *Puccinia substriata* por el micelio de *Sphaerellopsis paraphysata*, reduciendo hasta un 76% la tasa de germinación de las esporas y un 13.3 % la severidad de la enfermedad. El trabajo referido demuestra que el uso de hongos hiperparásitos

de la roya tienen el potencial de convertirse en un agente de control biológico para el manejo de esta. En Hidalgo y Puebla hay áreas de distribución de poblaciones silvestres de zarzamora con posibilidades de aislar potenciales hiperparásitos, lo que constituye una promisorio posibilidad para desarrollar tecnología de control biológico de la roya en zarzamora en nuestro país, motivo principal para la realización del presente estudio observacional exploratorio en México.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar morfológica y molecularmente la(s) roya(s) de *Rubus* sp. silvestre y sus hiperparásitos aislados de plantas de zonas silvestre de Hidalgo y Puebla con la finalidad de obtener organismos que tengan potencial de control biológico sobre este patógeno.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar la morfología y perfil molecular del agente causal de la roya en plantas de zarzamora silvestre de sitios de Hidalgo y de Puebla
- Identificar morfológica y molecularmente los hiperparásitos aislados de plantas silvestres de zarzamora con presencia de roya.

LITERATURA CITADA

- Ashmitha SP, Raguchander T and Johnson I. 2019. Occurrence of mycoparasitic fungi *Sphaerellopsis paraphysata* on pearl millet rust pathogen, *Puccinia substriata* in India. Madras Agricultural Journal 106:249-254. doi:10.29321/MAJ 2019.000255
- Díaz JAL, Galindo AJR, Rivero CMR y Leiva LC. 2011. Manejo Fitosanitario del Cultivo de la Mora (*Rubus glaucus* Benth). Medidas para la Temporada Invernal. Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). Bogotá D. C. Colombia. 32 p.
- Fact sheet. 2013. Orange rust. <https://www.planthealthaustralia.com.au/wpcontent/uploads/2013/09/Orange-rust-FS.pdf> (consulta, marzo 2022).
- Holst SK, Rivera-Coto G, Villalobos-Moya K, Orozco-Rodríguez R and Orozco-Cayasso S. 2017. *In vitro* tests of antagonist fungi to control blackberry Rust in Costa Rica. Agronomía Costarricense. Revista de Ciencias Agrícolas 41(1):19-32. <http://dx.doi.org/10.15517/rac.v41i1.29746>.
- López RA y García AJ. 2001. *Kuehneola loesneriana* Uredinales. Instituto de Genética Forestal, Universidad Veracruzana, Xalapa, Ver. México 31:1-3.
- Menéndez VJL. 2007. *Phragmidium violaceum* (Schultz) G. Winter. 154. ISSN 1887-5068. <https://www.asturnatura.com/especie/phragmidiumviolaceum.html> (consulta, marzo 2022).
- Muratalla-Lúa A, Jaen-Contreras D y Galarza Arévalo L. 2013. La producción de frambuesa y zarzamora en México. *Agro Productividad* 6(5):1-10.
- Rebollar AA, Leyva MSG, Mora AG, Valdovino PG y Romero CS. 2001. Identificación y biología del Agente causal de la roya de la frambuesa roja (*Rubus idaeus* L.) en México. Revista Mexicana de Fitopatología 19(2):168-174. <https://www.redalyc.org/pdf/612/61219206.pdf>
- Ricárdez LG, Aguilar RN, Galindo TME y Debernardi VTJ. 2016. Diagnóstico de la producción de zarzamora (*Rubus* sp.) en la Zona Centro de Veracruz, México. *Agro-productividad* 9 (6):34-38.
- Rodrigues VF, de Castro MH, Pontes SHM, Teixeira FCM, Teixeira de OI. 2021. First report of *Kuehneola uredinis* (Link) Arthur infecting blackberry in Brazil. Saudi Journal of Biological Sciences 28(12):6815-6817. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.07.057>
- Sherri S and Terrence K. 2008. Management of Important Blackberry Diseases in Arkansas. University of Arkansas, United States Department of Agriculture, and County Governments Cooperating. 4 p. <https://www.uaex.uada.edu/publications/pdf/FSA-7563.pdf>
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2022. https://nube.siap.gob.mx/avance_agricola/ (consulta, marzo 2022).

CAPITULO I. ENFERMEDADES FUNGOSAS DE LA ZARZAMORA

1.1. CULTIVO DE ZARZAMORA

La zarzamora es el fruto de la zarza, una planta arbustiva de la familia Rosácea y forma parte de los cuatro cultivos que comercialmente integran el grupo de las berries. El género comprende aproximadamente 700 especies que crecen generalmente de forma silvestre en gran parte de Europa, Asia y Norte América; especialmente en zonas con temperaturas frías, aunque existen variedades que se adaptan a climas templados y cálidos. En las zonas boscosas de México crece zarzamora silvestre y su frutilla es comestible. El fruto de la zarzamora es una baya de color negro brillante formada por la unión de numerosos frutos pequeños; es una fruta aromática y ácida, ricas en vitaminas y minerales (Muratalla *et al.*, 2013; Ricárdez *et al.*, 2016).

1.1.1. Descripción e importancia

La zarzamora es una frutilla con el mayor potencial en el mercado internacional, debido principalmente a sus características nutrimentales y a sus altos niveles de antioxidantes (Bushway *et al.*, 2008; Muratalla *et al.*, 2013).

Uno de los factores que ha permitido la expansión de este cultivo es el uso de variedades mejoradas con bajo requerimiento de frío que pueden adaptarse a condiciones templadas y tropicales, lo que representa ventaja competitiva como cultivo de exportación; esto ha ayudado a posicionar a México dentro de los primeros países productores del mundo, exportando 90 % de su producción (Muratalla *et al.*, 2013; Clark y Finn, 2014; Ricárdez *et al.*, 2016).

En México, en el año 2021, el Estado con la mayor producción de zarzamora fue Michoacán, reportando una superficie sembrada de 8 418 ha que concentró

aproximadamente el 88 % de la producción nacional, seguido por Jalisco con 811 ha, Colima con 157 ha y Baja California con 88 ha (SIAP, 2022).

Entre los países que cultivan zarzamoras, México destaca como el principal productor a nivel mundial una producción de 215 924 t (SIAP, 2021). En 2020, México exportó a 26 países, siendo Estados Unidos el mayor importador de zarzamora en el planeta, aproximadamente 85 mil toneladas de sus adquisiciones son en fresco y 13 mil congeladas. México le provee 86.7 % de sus compras totales (SIAP, 2021).

1.1.2. Clasificación taxonómica

De acuerdo con la Base de Datos del United States Department of Agriculture, USDA (USDA, 2022) y de European and Mediterranean Plant Protection Organization, EPPO (EPPO, 2022) se describe la clasificación taxonómica de la zarzamora como sigue:

Dominio: Eukaryota

Reino: Plantae

Filo: Magnoliopsida

Clase: Angiospermae

Orden: Rosales

Familia: Rosáceas

Subfamilia: Rosoideae

Género: *Rubus* L.

Especie: *Rubus fruticosus* L.

Nombre común: zarzamora común, zarzas, zarzamora silvestre, mora europea.

Otras especies del género *Rubus* encontradas en la base de datos de la EPPO (2022) que corresponden a las zarzamoras son las siguientes: *Rubus caesius* y *Rubus ulmifolius*.

1.1.3. Enfermedades fungosas de la Zarzamora

El cultivo de zarzamora es atacado por diversos hongos patógenos, entre los más importantes se encuentran:

Mildiú de la Zarzamora

El mildiú vellosa de la zarzamora causado por el oomiceto *Peronospora sparsa*, es una enfermedad sistémica que afecta la producción de moras en muchas regiones del mundo; es una de las enfermedades más destructivas en cultivos de zarzamora ya que puede alcanzar pérdidas del 100 % de la producción, principalmente en zonas con alta humedad relativa (Rebollar, 2011). El síntoma característico son manchas foliares púrpuras angulares y delimitadas por venas a lo largo de la nervadura. Estas manchas llegan a cubrir gran parte de la superficie de la hoja ocasionando su desprendimiento. Los frutos en desarrollo pierden su brillo, además de presentar una coloración rojiza y, por último, secarse. Otro síntoma importante de esta enfermedad es la formación de frutos dobles o partidos, huecos en la parte central (Rebollar *et al.*, 2009; Rebollar, 2011; Ali *et al.*, 2019).

Moho Gris

La podredumbre gris causada por *Botrytis cinerea* es una enfermedad responsable de las mayores pérdidas económicas en campo y en postcosecha del cultivo de zarzamora. Las principales fuentes de inóculo primario son los conidios que provienen de la germinación de los esclerocios, formados sobre tallos de zarzamora en descomposición, además puede vivir como saprófito en residuo de cultivos y otras plantas cultivadas como frutales y hortalizas, además de malezas (Rebollar, 2011; Li *et al.*, 2012; Archer *et al.*, 2021). La infección de *B. cinerea* se manifiesta como pudrición suave en flores de zarzamora, en frutos se observan zonas blandas de color marrón, tizones en inflorescencias, pústulas y manchas foliares, canchros en los tallos. Posteriormente se produce un micelio blanquecino de aspecto lanoso en el tejido infectado, el cual se vuelve gris durante la esporulación (Alencastro, 2011; Li *et al.*, 2012).

Cenicilla Polvorienta de la Zarzamora

La cenicilla causada por *Podosphaera aphanis* Wallr, infecta hojas, frutos y flores de plantas de zarzamora y causa importantes pérdidas de rendimiento (Santos *et al.*, 2002). La enfermedad comúnmente aparece en el follaje y en el envés de las hojas nuevas; se reconoce por las manchas blancas de aspecto polvoso blanquecino, pequeñas e irregulares. Mientras la cenicilla se desarrolla, las hojas comienzan a rizarse hacia arriba, esto es un síntoma de diagnóstico importante. Cuando las colonias de la cenicilla maduran, el tejido de la hoja extensivamente colonizado adquiere un color morado a rojizo, también pueden desarrollarse en el haz de la hoja y pueden causar manchas rojas, moradas o de color café (Gadoury *et al.*, 2010; Jin *et al.*, 2012; Asalf *et al.*, 2014). Este patógeno ataca a cultivos de frutillas tanto en estado vegetativo como en el reproductivo, el cual provoca la deformación de los frutos. En ambos casos se manifiesta como una eflorescencia blanquecina, constituida por el micelio y las estructuras reproductivas del hongo (Asalf *et al.*, 2016).

Marchitez en el cultivo de zarzamora

En los últimos años el cultivo de la zarzamora ha sido afectado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *mori* en regiones de México y California (Nieto *et al.*, 2019). Esta enfermedad se ha documentado con una incidencia que varía del 10 al 40% (Gordon *et al.*, 2016). En Michoacán se han detectado daños de importancia económica. Los primeros síntomas se presentan en la etapa vegetativa, manifestando flacidez de los brotes, con un ligero cambio de color que posteriormente deriva en secamiento de la planta. Al realizar un corte en los tallos afectados se observa la presencia de una franja café oscuro que se extiende de abajo hacia arriba generalmente en un lado del tallo (Rebollar y Silva, 2019). Las hojas más bajas presentan amarillamiento, inicia generalmente en el borde, en una sola parte de la hoja y posteriormente cubre el total de la lámina foliar incluyendo al tallo causando el secamiento de las áreas afectadas. Con el tiempo, debido a los daños en las raíces y corona, la planta va perdiendo su capacidad

de brotar, emitiendo brotes pequeños y débiles (Rebollar y Silva, 2019; Pastrana *et al.*, 2020).

Antracnosis

La especie *Glomerella cingulata* teleomorfo [estado sexual de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc], se identifica como causante de la antracnosis que destruye las cañas de la mora de castilla en la región andina de Venezuela (Cedeño y Ruiz, 2020); es una enfermedad que ocasiona pérdidas entre 53 % y 70 % en cultivos de mora (*Rubus glaucus*) en Colombia (Marulanda *et al.*, 2007; López *et al.*, 2013). La infección usualmente se origina en la base de las espinas y en tejidos jóvenes de cañas, pecíolos y pedúnculos. Las lesiones que se desarrollan en la base de las espinas al principio muestran tonalidad castaño-oscuro, pero al aumentar de tamaño, cambian a castaño-claro en el área central y presentan un borde o margen castaño-oscuro (Simpson, 2019; Cedeño y Ruiz, 2020). El microorganismo penetra en las ramas y tallos cortados durante las labores al cultivo, después colonizan en forma rápida todo el tejido, causando muerte descendente de la rama y muerte desde la base del tallo hacia las ramas superiores. Los primordios infectados no alcanzan a producir frutos con valor comercial. La enfermedad puede atacar los racimos y momificar los frutos (Lopez *et al.*, 2013; Cedeño y Ruiz, 2020).

1.1.4. Royas en cultivos de Zarzamora

La roya se encuentra dentro de las enfermedades de importancia en zarzamora. Gran diversidad de hongos fitopatógenos causantes de esta enfermedad se ha reportado; sin embargo, tres especies se consideran las más importantes (Gauthier y Sayre, 2021; Rodrigues *et al.*, 2021). Estas especies se describen a continuación:

1.1.4.1. Roya anaranjada

La roya anaranjada la causa el hongo *Arthuriomyces peckianus* (Howe) Cummins & Y. Hiratsuka. De acuerdo con EPPO (2022), su sinonimia es: *Gymnoconia interstitialis* Lagerheim, *Gymnoconia nitens* (Schweinitz) F. Kern y HW Thurston, *Gymnoconia peckiana* (Howe) Trotter, *Kunkelia nitens*, (Schweinitz) Arthur y *Puccinia peckiana* Howe.

La roya anaranjada es la más común y agresiva que ataca las plantas silvestres y cultivadas de zarzamora, incluidos los tipos sin espinas. Rara vez mata a las plantas, pero se debilitan y producen poca o ninguna fruta (Sherri y Terrence, 2008; Bolda y Koike, 2012; Fact sheet. 2013). Los primeros síntomas de la roya anaranjada son brotes débiles, delgados, carecen de espinas y son más susceptibles al mildiú polvoriento. Las hojas son atrofiadas, deformadas y de color verde pálido a amarillento (Figura 1 A-1). Varias semanas después, en el envés se cubren con pústulas inicialmente cerosas, pero se vuelven polvorientas y de color naranja brillante (Figura 1 A-2). Las plantas se infectan sistémicamente, aunque los primocanos y floricanos pueden parecer sanos (Sherri y Terrence, 2008; Fact sheet. 2013; Archer *et al.*, 2021). Los brotes enfermos limitan el crecimiento de la caña y la propagación de las plantas. Surgen varias yemas dando la apariencia de una planta abultada conocida como "escoba de bruja". Las plantas infectadas con la forma demicíclica desarrollan telias oscuras. La roya anaranjada se confunde fácilmente con la roya no sistémica del tallo y la hoja causada por *Kuehneola uredinis* (Sherri y Terrence, 2008; USA, 2015).

1.1.4.2. Roya de caña y hoja

La roya de la caña y de la hoja, causado por *Kuehneola uredinis* (Link) Arthur, es una enfermedad que representa un problema importante de defoliación. En California ha dañado principalmente plantas de zonas silvestre de *Rubus ursinus* Cham. & Schldl. Los síntomas se presentan principalmente en hojas viejas, crecen pústulas amarillas en el haz y en los bordes (Figura 1 B-1). Sobre el haz se observan manchas circulares y angulares rodeadas de tejido necrótico color marrón-rojizo, en algunas ocasiones crecen pequeñas pústulas sobre el envés

de color amarillo anaranjado brillante. Los Uredinios miden entre 100 y 400 μm de diámetro. Las urediniosporas son ampliamente obovoides, de color amarillo anaranjado pálido, y miden de 24 a 40 $\times$ 22 a 32 μm . Las pústulas se rompen a través de la corteza y dan como resultado cañas quebradizas que se rompen fácilmente (Figura 1 B-2). La defoliación prematura, que provoca estrés y pérdida de vigor de la planta, puede ocurrir si las infecciones de las hojas son graves. En 2018 se detectaron síntomas en plantas de zarzamora silvestre en el Condado de Monterrey, California, EE. UU. en 2021 se identificó en Campos Experimentales de zarzamora en Diamantina, Estado de Minas Gerais, Brasil y en 2022 se observaron síntomas en la variedad 'Kiowa' de zarzamora en Florida, EE. UU. (Shands *et al.*, 2018; Gauthier y Sayre, 2021; Rodrigues *et al.*, 2021; Marin *et al.*, 2022).

1.1.4.3. Roya amarilla tardía

La roya es causada por *Pucciniastrum americanum* (Farl.) Arth., conocido comúnmente en Norte América como la roya amarilla tardía de la frambuesa. Este hongo se ha presentado en cultivos de frambuesa en México. Los síntomas inician en el envés de las hojas inferiores y en los peciolo en forma de pequeñas pústulas aisladas, que después se transforman en masas de esporas de color amarillo cubriendo todo el tejido foliar con infecciones que alcanzan el 70 % (Figura 1 C-1). Sobre el haz se notan puntos amarillos que posteriormente se tornan necróticos y se unen, originando áreas de mayor tamaño a la par de un amarillamiento de las hojas. En infecciones severas puede haber defoliación, permaneciendo solo las hojas jóvenes. Próximo a la floración, las pústulas aparecen en el cáliz de la flores y frutos en todas las etapas de desarrollo (Figura 1 C-2). Las drupelas infectadas no se desarrollan normalmente y maduran muy rápido que las sanas, lo que afecta severamente la calidad para la comercialización. Las uredosporas son de color amarillo brillante con aspecto aceitoso, de forma ocooides, elípticas o esféricas, con la pared hialina y equinulada. Están cubiertas por un peridio de pared hialina y forma de cono

globoso y raramente cilíndrico, localizado en el envés de la hoja y sobre el tejido epidérmico (Rebollar *et al.*, 2001; Archer *et al.*, 2021).

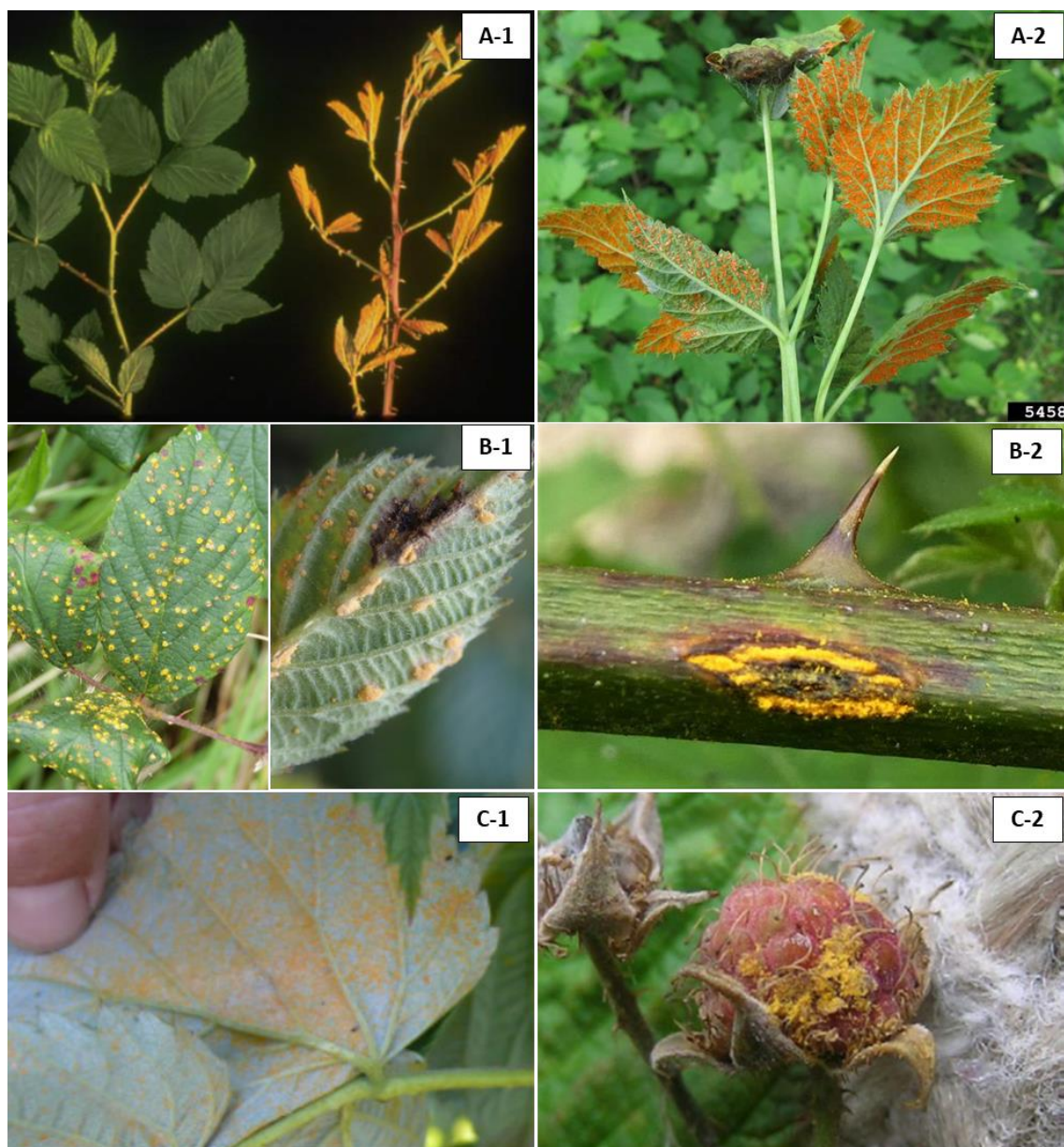


Figura 1. Síntomas de roya en plantas de zarzamora. A-1 y A-2, brotes infectados con *Arthuriomyces peckianus* (Gauthier y Sayre, 2021); B-1 (hoja-haz y envés) y B-2 (tallo), con síntomas de *Kuehneola uredinis* (GBIF, 2021); C-1 (hoja) y C-2 (fruto), infectados con *Pucciniastrum americanum* (Gauthier y Sayre, 2021).

1.1.4.4. Otras royas

En cultivos de las zarzamoras también se pueden encontrar los agentes causales de roya que a continuación se presenta.

La roya causada por *Phragmidium violaceum* (Schultz) G. Winter se encuentra en toda Europa y el norte de África parasitando plantas del género *Rubus* como las zarzamoras. Causa manchas foliares violáceas en el haz (Figura 2 A-1), pero los uredosporas (color anaranjado) y telios (negruzcos) surgen en el envés (Figura 2 A-2). Los espermogonios se forman bajo la cutícula del haz de la hoja y aparecen densas dispuestos en puntos negros. El hongo pasa el invierno en forma de teliosporas en el follaje de otoño. Las esporas se forman en pequeñas cadenas, miden 19 - 30 x 17- 25 µm, de forma ovoide a elipsoidal, con la pared hialina; están ornamentadas con verrugas aculeadas; tienen varios poros germinativos y el contenido es amarillento (Figura 2 A-3). Al germinar originan los telios, también en el envés de la hoja, formando grupos de hasta 1.5 mm, circulares o alargados, negros, que provocan que la hoja se torne violeta en el haz en la zona donde está el telio (de donde proviene el nombre violaceum). En el condado de Humboldt, California, EE. UU. esta especie se identificó por primera vez en plantas de zarzamora en 2005 (Aimé y Rossman, 2007; Galan, 2014).

La roya amarilla de la mora de Castilla es causada por el hongo *Gerwasia lagerheimii* (Magnus) Buriticá. El patógeno presenta pústulas de color anaranjado sobre el envés de las hojas (Figura 2 B-1), y por el haz se observan lesiones hundidas rodeadas de una coloración violácea (Figura 2 B-2). En los tallos produce agrietamientos (Figura 2 B-3); el hongo ataca también a peciolo, flores y frutos (Díaz *et al.*, 2011; Saldarriaga *et al.*, 2020).

La roya causada por *Kuehneola loesneriana* (Arth.) infecta a plantas de *Rubus* sp., produce pústulas muy llamativas de color amarillo-oro de 7 mm de diámetro, son de aspecto verrugoso anfígenas y caulículas, con un halo café-rojizo y

pulverulentas. Contienen uredinios con urediniosporas ovoide elipsoidales, de color amarillo claro y miden de 23.4-36.4 x 14.3 - 16.9 μm (Lopez y García, 2001).

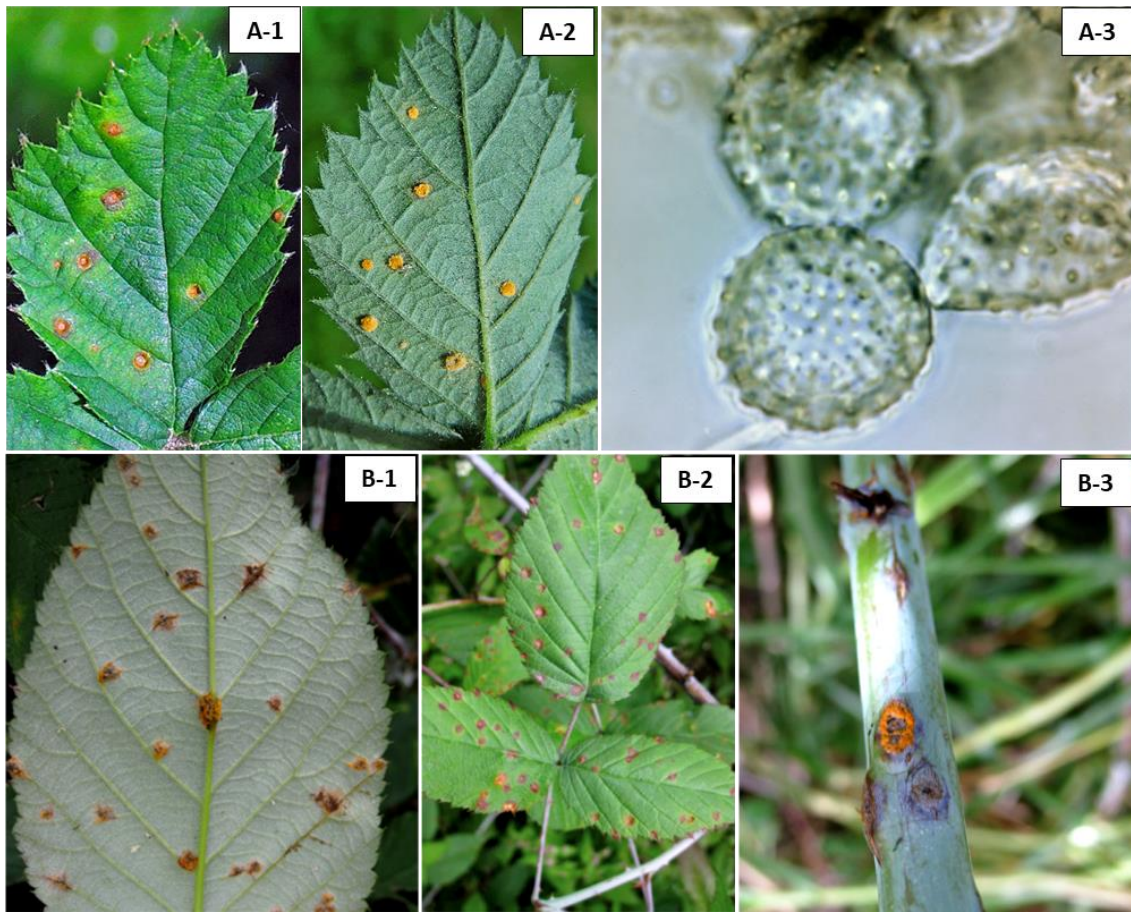


Figura 2. Plantas de zarzamora. A-1 (envés) y A-2 (haz), hojas infectadas de *Phragmidium violaceum*; A-3, urediniosporas (Érsek, 2019); B-1 (envés), B-2 (haz) y B-3 (tallo) con síntomas de *Gerwasia lagerheimii* (Saldarriaga et al., 2020).

1.2. ANTECEDENTES DE HIPERPARÁSITOS EN ROYAS

Diferentes investigaciones han reportado gran diversidad de especies de hongos como hiperparásitos de varias especies de roya, pero pocos los estudios que se han enfocados en caracterizar a los hiperparásitos encontrados en Rosáceas.

En Inglaterra se encontró a *Eudarluca caricis*, (teleomorfo de *Sphaerellopsis filum*) en la roya *Phragmidium violaceum* en zarzamora (Yuan et al., 1998).

De zarzamora cultivada en Costa Rica, se aislaron hongos asociados con pústulas de roya causadas por *Kuehneola* spp., entre ellos *Pestalotia* spp., *Sphaeropsis* spp., *Botrytis* spp., *Verticillium* spp., *Macrophomina* spp., *Cladosporium* spp., *Phoma* spp., *Colletotrichum* spp., *Rhizoctonia* spp., *Libertella* spp., *Paecilomyces* spp., y varios micelios estériles no identificados; para establecer el posible efecto antagonista de los hongos sobre la germinación de las uredosporas de *Kuehneola* spp. se realizaron ensayos *in vitro*, encontrando que *Cladosporium* presenta mayor efecto de inhibición en la germinación de las uredosporas de *Kuehneola* spp. (Holst et al., 2017).

La roya *Frommeëlla mexicana* var. *indicae* (Uredinales) se observó por primera vez en Bélgica en hojas de *Duchesnea indica* (Rosáceae) conocida comúnmente como falsa fresa. Sobre las uredias se identificaron dos hongos hiperparásitos que han sido reportados como parásitos de uredinales en diferentes especies de roya: 1) *Sphaerellopsis filum* y 2) *Lecanicillium muscarium* (tentativamente) (Fraiture y Vanderweyen, 2007).

1.3. LITERATURA CITADA

- Aime MC and Rossman AY. 2007. First Report of the rust *Phragmidium violaceum* on Pennsylvania Blackberry in California. Disease Notes. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-11-1517C>
- Alencastro CLM. 2011. Alternativas Ecológicas para el Control del Moho Gris (*Botrytis cinerea*) en Mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth). Escuela Politécnica del Ejército. Departamento de Ciencias de la Vida. Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias. Sangolquí- Ecuador. 110 p.
- Ali ME, Hudson O, Waliullah S, Brock J, Hayes B, Williams WJL and Oliver JE. 2019. First report of downy mildew on blackberry caused by *Peronospora sparsa* in Georgia, U.S.A. The American Phytopathological Society (APS) 104 (3):996. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-19-1962-PDN>
- Archer L, Carroll J y Pritts M, eds. 2021. Production and IPM Guide for Organic Raspberries and Blackberries. Nueva York. New York State Integrated Pest Management Program. Ithaca, N.Y. Publication No. 228. 62 p.
- Asalf B, Gadoury DM, Tronsmo AM, Seem RC, Dobson A, Peres NA and Stensvand A. 2014. Ontogenic resistance of leaves and fruit, and how leaf folding influences the distribution of powdery mildew on strawberry plants colonized by *Podosphaera aphanis*. Phytopathology 104:954- 963.
- Asalf B, Gadoury DM, Tronsmo AM, Seem RC and Stensvand A. 2016. Effects of development of ontogenic resistance in strawberry leaves upon pre-and postgermination growth and sporulation of *Podosphaera aphanis*. Plant Disease 100:72-78.
- Bushway L, Pritts M and Handley D. 2008. Raspberry & Blackberry Production Guide For the Northeast, Midwest, and Eastern Canada. NRAES (Natural Resource, Agriculture, and Engineering Service). Ithaca, New York. 167 p.
- Bolda M y Koike S. 2012. Un Discurso sobre el *Botrytis* en la fresa y la mora (Frambuesa). <https://ucanr.edu/blogs/blogcore/postdetail.cfm?postnum=8770> (consulta, marzo 2022).
- Cedeño L. y Ruiz AR. 2020. Descripción de Enfermedades que Atacan la Mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth.) en Venezuela. Experiment Findings. 21 p. DOI: [10.13140/RG.2.2.12938.82887](https://doi.org/10.13140/RG.2.2.12938.82887)
- Clark JR and Finn CE, 2014. Blackberry Cult Ivat Ion in the world. Review Brazilian Fruticulture 36 (1):046 -057. <https://doi.org/10.1590/0100-2945-445/13>
- USA, Cornell University Plant Pathology Department. 2015. Orange Rust: *Gymnoconia* sp. and *Arthuriomyces* sp. Plant Disease Diagnostic Clinic. Ithaca, New York. 2 p.
- Díaz JAL, Galindo AJR, Rivero CMR y Leiva LC, 2011. Manejo Fitosanitario del Cultivo de la mora (*Rubus glaucus* Benth). Medidas para la temporada

- invernal. Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). Bogotá D. C. Colombia. 32 p.
- EPPO, European and Mediterranean Plant Protection Organization. 2022. *Rubus fruticosus* (RUBFR). <https://gd.eppo.int/taxon/RUBFR> (consulta, marzo 2022).
- Érsek L., 2019. *Phragmidium violaceum* (Schultz) Winter, 1880 on *Rubus*. Plant Parasites of Europe: leafminers, galls and fungi. Hungría, Budapest, Húvösvölgy, <https://bladmineerders.nl/parasites/fungi/basidiomycota/pucciniomycotina/pucciniales/phragmidiaceae/phragmidium/phragmidium-violaceum/> (consulta, abril 2022).
- Fact sheet. 2013. Orange rust. <https://www.planthealthaustralia.com.au/wp-content/uploads/2013/09/Orange-rust-FS.pdf> (consulta, marzo 2022).
- Fraiture A et Vanderweyen A. 2007. *Frommeëlla mexicana*, nouvelle rouille pour la flore belge, et trois hyperparasites vivant à ses dépens. Revue du Cercle de Mycologie de Bruxelles 7:5-20.
- Gadoury DM, Asalf B, Heidenreich MC, Herrero ML, Welser MJ, Seem RC, Tronsmo AM and Stensvand A. 2010. Initiation, development, and survival of cleistothecia of *Podosphaera aphanis* and their role in the epidemiology of strawberry powdery mildew. Phytopathology 100:246-251.
- Galan CB. 2014. *Phragmidium violaceum*. <https://tubiologia.forosactivos.net/t8521-phragmidium-violaceum#top> (consulta, abril 2022).
- Gauthier N and Sayre J. 2021. Rust Diseases of Brambles. Plant Pathology Fact Sheet. University of Kentucky. College of Agriculture, Food and Environment. PPFS-FR-S-06. 1-5 p.
- GBIF, the Global Biodiversity Information Facility. 2021. *Kuehneola uredinis* (Link) Arthur. GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org (consulta, abril 2022).
- Gordon TR, Kirkpatrick SC, Henry PM, Kong M y Broome JC. 2016. First report of a Wilt disease of blackberry caused by *Fusarium oxysporum* in California. The American Phytopathological Society 100 (5):1018-1018.
- Holst SK, Rivera-Coto G, Villalobos-Moya K, Orozco-Rodríguez R and Orozco-Cayasso S. 2017. *In vitro* tests of antagonist fungi to control blackberry rust in Costa Rica. Agronomía Costarricense. Revista de Ciencias Agrícolas 41(1):19-32.
- Jin X, Hall AM, Huang YJ & Fitt BDL. 2012. Development and maturation of the chasmothecia of *Podosphaera aphanis* on strawberry. Aspects of Applied Biology 117:235–239.
- Li X, Kerrigan J, Chai W and Schnabel G. 2012. *Botrytis caroliniana*, a new species isolated from blackberry in South Carolina. Mycologia 104(3):650-658.

- Lopez RA y García AJ. 2001. *Kuehneola loesneriana* Uredinales. Instituto de Genética Forestal, Universidad Veracruzana, Xalapa, Ver. México 31:1-3.
- López VJM, Castaño ZJ, Marulanda AML y López GAM. 2013. Caracterización de la resistencia a la antracnosis causada por *Glomerella cingulata* y productividad de cinco genotipos de mora (*Rubus glaucus* Benth.). Fitomejoramiento. Acta Agronómica 62(2):174-185.
- Marín MV, Seijo TE, Druffel K, Deng Z and Peres NA. 2022. First Report of Leaf Rust on Blackberry (*Rubus* spp.) Caused by *Kuehneola uredinis* in Florida. The American Phytopathological Society. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-21-2580-PDN>
- Marulanda AML, Isaza VL and Ramírez TAM. 2007. Identification of *Colletotrichum* specie responsable for anthracnose of Andean blackberry in crops grown in Colombia. Universidad Tecnológica de Pereira. Scientia et Technica 37: 585-590. ISSN 0122-1701.
- Muratalla-Lúa A, Jaen-Contreras D y Galarza Arévalo L. 2013. La producción de frambuesa y zarzamora en México. Agro Productividad 6(5):1- 10.
- Nieto CA, Rodríguez MD y Rojas SML. 2019. Caracterización patogénica de aislamientos mexicanos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *mori* en zarzamora. Uso en estudios de susceptibilidad varietal y alternativas de control *In Vitro*. Revista Mexicana de Fitopatología 37:123-125.
- Pastrana AM, Cline WO, Wong TW, Watson DC, Mercier J, Ivors K, Broome JC, Quesada-Ocampo LM and Gordon TR. 2020. First Report of *Fusarium* Wilt of Blackberry Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *mori* in North Carolina. The American Phytopathological Society 104 (3): 971. doi: 10.1094/PDIS-09-19-1980-PDN
- Rebollar AA, Leyva MSG, Mora AG, Valdovino PG y Romero CS. 2001. Identificación y biología del agente causal de la roya de la frambuesa roja (*Rubus idaeus* L.) en México. Revista Mexicana de Fitopatología 19(2):168-174. <https://www.redalyc.org/pdf/612/61219206.pdf>
- Rebollar AA y Silva RHV. 2019. La marchitez de la Zarzamora. Diagnóstico, Epidemiología y Manejo Integrado. Universidad Autónoma Chapingo. 1:9-50. DOI: 10.6084/m9.figshare.13808543
- Rebollar AA. 2011. Manejo del Mildiú y el Moho gris de la Zarzamora en Michoacán. México 1:12-34.
- Rebollar AA, Silva RHV, Zelaya MLX and Ellis MA. 2009. First report of *Peronospora sparsa* causing downy mildew (dryberry) of *Rubus fruticosus* in México. The American Phytopathological Society 93(6):674-674
- Ricárdez LG, Aguilar RN, Galindo TME y Debernardi VTJ. 2016. Diagnóstico de la producción de Zarzamora (*Rubus* sp.) en la Zona Centro de Veracruz, México. Agro-productividad 9 (6):34-38.

- Rodrigues VF, de Castro MH, Pontes SHM, Teixeira FCM and Teixeira de OI. 2021. First report of *Kuehneola uredinis* (Link) Arthur infecting blackberry in Brazil. Saudi Journal of Biological Sciences 28(12):6815-6817. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.07.057>
- Santos B, Blanco C, Porras M, Barrau C and Romero F. 2002. First confirmation of *Sphaerotheca macularis* on strawberry plants in Southwestern Spain. Plant Disease 86(9):1049. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.9.1049C>
- Saldarriaga CA, Betancourt VM, Tamayo MPJ, Martínez LEP, Zapata NYA, Beltrán ACR, y Cotes PAM, 2020. Tecnología para el cultivo de la mora (*Rubus glaucus* Benth.). Colección Transformación del Agro. Primera Edición. Agrosavia. Mosquera, Colombia. 239 p.
- Shands AC, Grandall SG and Miles TD. 2018. First report of Leaf rust on California blackberry (*Rubus ursinus*) caused by *Kuehneola uredinis* in California. Plant Disease 102(3):682-682.
- Sherri S and Terrence K. 2008. Management of Important Blackberry Diseases in Arkansas. University of Arkansas, United States Department of Agriculture, and County Governments Cooperating. 4 p. <https://www.uaex.uada.edu/publications/pdf/FSA-7563.pdf>
- SIAP, Servicio De Información Agroalimentaria y Pesquera. 2022. https://nube.siap.gob.mx/avance_agricola/ (consulta, marzo 2022).
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2021. Panorama Agroalimentario. México. Edición del año 2021:143-144
- Simpson M. 2019. Berry Plant Protection Guide. Department of Industry. State of New South Wales through NSW. 100 p.
- USDA, United States Departamento of Agriculture. 2022. Plants data base: *Rubus glaucus* Benth Andes Berry. <https://plants.usda.gov/home/plantProfile?symbol=RUFR80> (consulta, marzo 2022).
- Yuan ZW, Pei MH, Hunter T and Royle DJ. 1998. *Eudarluca caricis*, the teleomorph of the mycoparasite *Sphaerellopsis filum*, on blackberry rust *Phragmidium violaceum*. Printed in the United Kingdom. Mycological Research 102(7):866-868

CAPITULO II. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LAS ROYAS EN *Rubus* sp. SILVESTRE DE HIDALGO Y PUEBLA

2.1. RESUMEN

En los municipios Zacatlán y Huauchinango, Puebla y de Acaxochitlán, Hidalgo se recolectaron muestras representativas de plantas silvestres de zarzamora (*Rubus* sp.) con síntomas de roya en hojas y tallos, y se trasladaron al laboratorio de Patosistemas Vegetales en el Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo. Sobre el haz, envés y en los bordes de las hojas se observaron, distribuidas, pequeñas pústulas con uredosporas de color amarillo-anaranjado brillante. Las pústulas oscilaban entre 131 a 249 μm de ancho y de 224 a 458 μm de largo, rodeadas por manchas de color amarillo-claro que posteriormente se tornaron a marrón-rojizo. De las uredosporas se realizó extracción de ADN y con los iniciadores universales ITS1 e ITS4 se hizo la amplificación. Los resultados de la comparación de la secuencia de roya en la base de datos con el programa BLAST indicaron un porcentaje de identidad de 85.13% con *Kuehneola uredinis*. De acuerdo con la caracterización morfológica y molecular se concluyó que el agente causal de la roya en zarzamoras silvestres fue *Kuehneola uredinis*.

Palabras clave: *Rubus* sp., uredosporas, pústulas, ITS, *Kuehneola uredinis*.

2.2. ABSTRACT

In the municipalities representative samples of wild blackberry plants (*Rubus* sp.) with rust symptoms on leaves and stems were collected from Zacatlán and Huauchinango, Puebla and from Acaxochitlán, Hidalgo, and transferred to the Laboratory of Plant Pathosystems in the Department of Agricultural Parasitology of the University Autonomous Chapingo. Distributed small pustules with bright yellow-orange uredospores were observed on the upper surface, underside and on the edges of the leaves. The pustules ranged from 131 to 249 μm wide and 224 to 458 μm long, surrounded by light-yellow spots that later turned reddish-brown. DNA extraction was performed from the uredospores and amplification was performed with the universal primers ITS1 and ITS4. The results of the comparison of the rust sequence in the database with the BLAST program indicated an identity percentage of 85.13% with *Kuehneola uredinis*. According to the morphological and molecular characterization, it was concluded that the causal agent of rust in wild blackberries was *Kuehneola uredinis*.

Key words: *Rubus* sp., uredospores, pustules, ITS, *Kuehneola uredinis*.

Tesis, Universidad Autónoma Chapingo

Author: Erida Yasmin López Vásquez

Advisor: Dr. Dimas Mejía Sánchez

2.3. INTRODUCCIÓN

Las zarzamoras alguna vez se consideraron solo una fruta silvestre, pero el cultivo de esta planta domesticada se ha vuelto importante en Estados Unidos y otros países del mundo. La zarzamora pertenece a la familia de *Rosaceae*, subgénero *Rubus* Watson (Clark y Finn, 2014). México se ha posicionado como el principal productor a nivel mundial de zarzamora, siendo Michoacán el estado quien reporta mayor superficie sembrada (SIAP, 2021).

Entre los principales problemas que enfrenta este cultivo se encuentran las enfermedades causado por hongos, entre ellas la roya. Algunos autores han clasificado tres especies como las más importantes para este cultivo: roya naranja (*Arthuriomyces peckianus*); roya de la caña y de la hoja (*Kuehneola uredinis*); roya amarilla tardía (*Pucciniastrum americanum*) (Gauthier y Sayre, 2021; Rodrigues *et al.*, 2021). En el condado de Monterey, California en Estados Unidos se observaron síntomas de roya en hojas de plantas silvestres de zarzamora, identificando al hongo *Kuehneola uredinis* (Link) Arth (Shands *et al.*, 2018). Hasta el momento, son escasos otros antecedentes sobre agentes fúngicos responsables de la roya en zarzamoras silvestres.

Al Noroeste de Puebla, cerca de los límites con el Estado de Hidalgo, crecen plantas de zarzamora de forma silvestre, sin embargo, las condiciones agroclimáticas propician la incidencia de roya sobre estas plantas, lo cual afecta el desarrollo vegetal. Hasta el momento no se ha caracterizado los síntomas en tallos y hojas en poblaciones silvestres de zarzamora en México, por lo que el presente estudio tuvo como objetivo identificar morfológica y molecularmente al agente causal de la roya que se presenta en plantas de zarzamora silvestre en municipios de Zacatlán y Huauchinango pertenecientes al Estado de Puebla y de Acaxochitlán, en el Estado de Hidalgo de donde se tienen referencias empíricas de su distribución.

2.4. MATERIALES Y MÉTODOS

2.4.1. Área de muestreo del material biológico

Las muestras del material biológico se obtuvieron en zonas silvestres (Figura 3), localizadas en municipios de los estados de Hidalgo (Acaxochitlán) y de Puebla (Zacatlán y Huauchinango), las coordenadas se describen en el Cuadro 1. Durante recorridos en algunos sitios se detectaron plantas de zarzamora silvestre infectadas con roya.



Figura 3. Sitios muestreados. Acaxochitlán, Hidalgo (A), Huauchinango, Puebla (B), Zacatlán, Puebla (C). Fotografías propias (López-Vásquez, 2022).

Cuadro 1. Referencia geográfica de los sitios muestreados

Municipio	Estado	Coordenadas		Altitud (msnm)
		Latitud Norte	Longitud Oeste	
Acaxochitlán	Hidalgo	20° 08' 24.56"	98° 08' 44.77"	2 135.94
Zacatlán	Puebla	19° 56' 15.71"	98° 00' 23.64"	2 412.68
Huauhinango	Puebla	20° 07' 8.23"	98° 06' 21.03"	2 082.22

Técnica de muestreo

El muestreo se realizó de forma aleatoria en los sitios antes mencionados. Con una lupa Carson 60X se buscó crecimiento activo de roya en las hojas, tallos y frutos. Al mismo tiempo se buscó que las pústulas de roya presentaran signos de hiperparásito.

Las muestras fueron almacenadas en bolsas herméticas Ziploc previamente etiquetadas y se conservaron en frío para transportarlas al laboratorio de Patosistemas Vegetales dependiente del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo.

2.4.2. Caracterización morfológica de la roya

Las hojas con síntomas se analizaron en el haz y envés de la hoja con un microscopio estereoscópico para describir los síntomas causados por la roya. Se realizó una descripción detallada del tamaño de las pústulas, presencia de uredosporas, forma, color, agrupación y consistencia de acuerdo con la caracterización morfológica descritas por Zuluaga *et al.* (2010), además se tomó como referencia las descripciones publicadas por Molinas y Fontarnau (1976) y León (2016).

En un microscopio compuesto Cx-31 OLYMPUS® se observaron 100 uredosporas y se midieron las variables largo y ancho. Con un microscopio Electrónico de Barrido y operado a 10 Kv (JSM-6390/LGS; Jeol, Tokyo, Japón) de la Unidad de Microscopia Electrónica del Colegio de Posgraduados se tomaron medidas y parámetros de pústulas, uredosporas y equinulaciones.

2.4.3. Identificación molecular de la roya

La extracción de ADN se realizó siguiendo el protocolo tradicional CTAB descrito por Alejos *et al.* (2014) con algunas modificaciones. Con un microscopio estereoscopio se seleccionaron hojas de zarzamora con crecimiento activo de roya y, con una aguja hipodérmica se recolectaron uredosporas, mismas que se depositaron en un tubo Eppendorf de 1.5 ml previamente etiquetado; se cuidó de no introducir agentes diferentes a las uredosporas.

A las muestras se le adicionó 500 µL de CTAB 2 % (SDS 2 %; NaCl 1.4 M; Tris 100 mM; EDTA 50 mM) y se incubaron a 65 °C durante 20 minutos. Pasado el tiempo referido, a cada tubo se le adicionó 700 µL de cloroformo, se mezcló por inversión y se centrifugó a 13 000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se recuperó para ponerlo en otro tubo Eppendorf, se le adicionó 2 µL de RNAsa, se mezcló por inversión y se incubó por 20 min a 37 °C. Transcurrido el tiempo respectivo, a la muestra se le agregó 700 µL de Isopropanol frío, se mezcló por inversión, se incubó durante 5 minutos a -80 °C y se centrifugó durante 10 minutos a 13 000 rpm. Terminado el tiempo se desechó el sobrenadante, se le agregó 500 µL de etanol al 70 %, se mezcló por inversión y nuevamente se centrifugó a 13 000 rpm durante 10 min. Por último, se eliminó todo el sobrenadante cuidando de no desprender la pastilla de ADN; se dejó secar a temperatura ambiente sobre una toalla de papel sanita estéril durante 20 min. Al ADN se le rehidrató agregando 40 µL de agua grado biología molecular (Alejos *et al.*, 2014).

La concentración y pureza de ADN se verificó mediante espectrofotometría, utilizando un NanoDrop marca Quawell UV Spectrophotometer Q3000 (BancoADN, 2020).

La amplificación molecular del ADN se realizó mediante Reacciones en Cadena de Polimerasa (PCR), utilizando los iniciadores universales ITS1 (5'-32 CTTGG TCATTTAGAGGGAAGTAA-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') para la amplificación de regiones del ADN ribosomal, que comprende las regiones ITS1, 5.8S e ITS2, y parte de la región 28S (White *et al.*, 1990; Cristancho *et al.*, 2007; Pérez, 2020).

Para preparar la reacción de amplificación se utilizó la solución OmniPCR (OnePCR Ultra) BIO-HELIX. Las reacciones previstas siguieron las indicaciones del protocolo estándar del producto, Cuadro 2.

Cuadro 2. Reactivos utilizados en un tubo Eppendorf de 1.5 mL para una reacción

Reactivos	Reacción (50 µL)
OmniPCR (OnePCR Ultra)	25 µL
Iniciador ITS 1 (8 ng·µL ⁻¹)	2 µL
Iniciador ITS 4 (8 ng·µL ⁻¹)	2 µL
ADN (10 ng/µL ⁻¹)	1 µL
Agua grado PCR	20 µL

Las reacciones fueron colocadas en un termociclador con las condiciones de amplificación para ITS tomando como referencia lo reportado por Serrato *et al.* (2014): una etapa de desnaturalización inicial de 95 °C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 segundos, alineamiento a 55 °C por 1 minuto y una extensión a 72 °C por 1 minuto; y un paso final de extensión a 72 °C por 10 min. Los productos de amplificación fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa al 2 %. La visualización de las bandas amplificadas se realizó en un transiluminador MiniBIS-Pro.

Para su secuenciación las reacciones fueron enviados al Laboratorio de la compañía Macrogen© en Korea.

Las secuencias se analizaron utilizando el programa Chromas 2.6.6. Posteriormente se ensamblaron con ayuda del programa DNASTAR Lasergene y comparadas en la Base de Datos Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Finalmente, se realizó un análisis filogenético utilizando el programa MEGA 11 (64-bit), se incluyeron siete especímenes de los cuales seis se obtuvieron del Genbank (Lessa *et al.*, 2015).

2.5. RESULTADOS

En los sitios muestreados de los Estados de Puebla e Hidalgo, se encontraron plantas de zarzamora silvestre con síntomas en tallos y hojas como se muestra en la Figura 4.

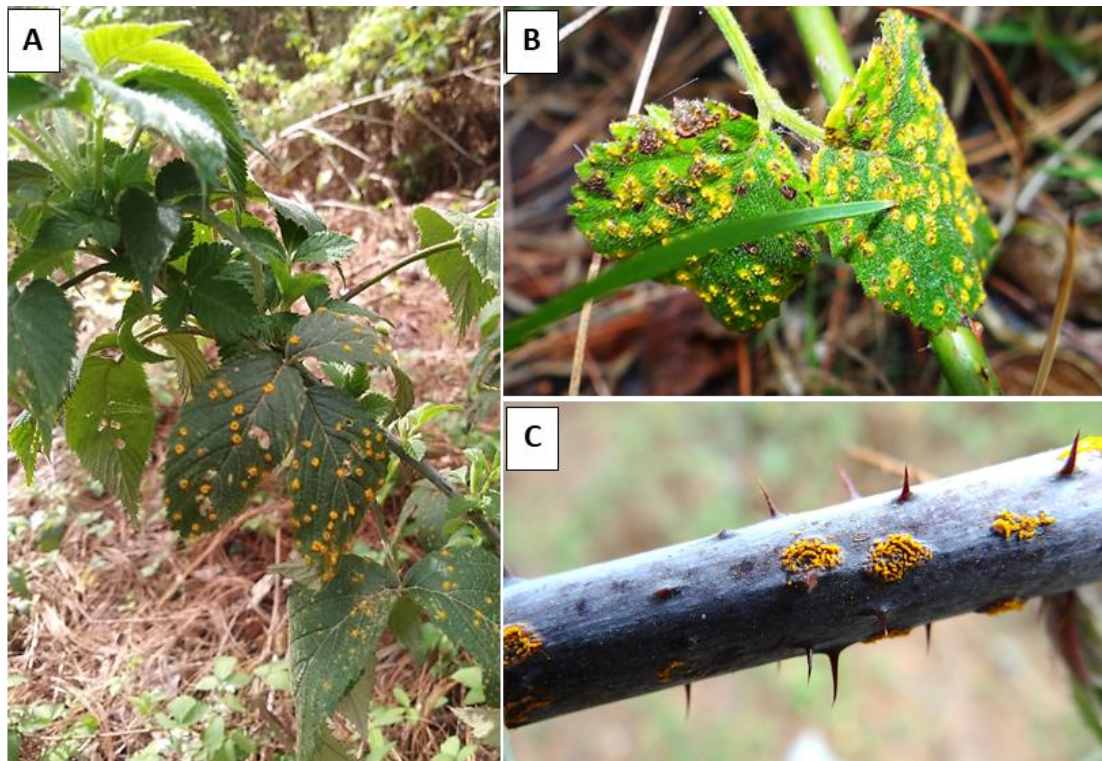


Figura 4. A y B. Plantas de zarzamora silvestre con síntomas de roya en hoja; C. Roya en tallo. Fotografías propias (López-Vásquez, 2022).

2.5.1. Caracterización morfológica de la roya

Pequeñas pústulas con uredosporas de color amarillo-anaranjado brillante distribuidas se observaron sobre el haz, envés y en los bordes de las hojas de zarzamora silvestre. En algunas plantas se encontraron signos sobre los tallos. En hojas avejentadas la incidencia de la roya aumenta. También se observaron pústulas con uredosporas en crecimiento activo (Figura 5A), además se encontraron soros (Figura 5B). Las pústulas oscilaban entre 131 a 249 μm de ancho y de 224 a 458 μm de largo, rodeadas por manchas de color amarillo-claro que posteriormente se tornan a un color marrón-rojizo.

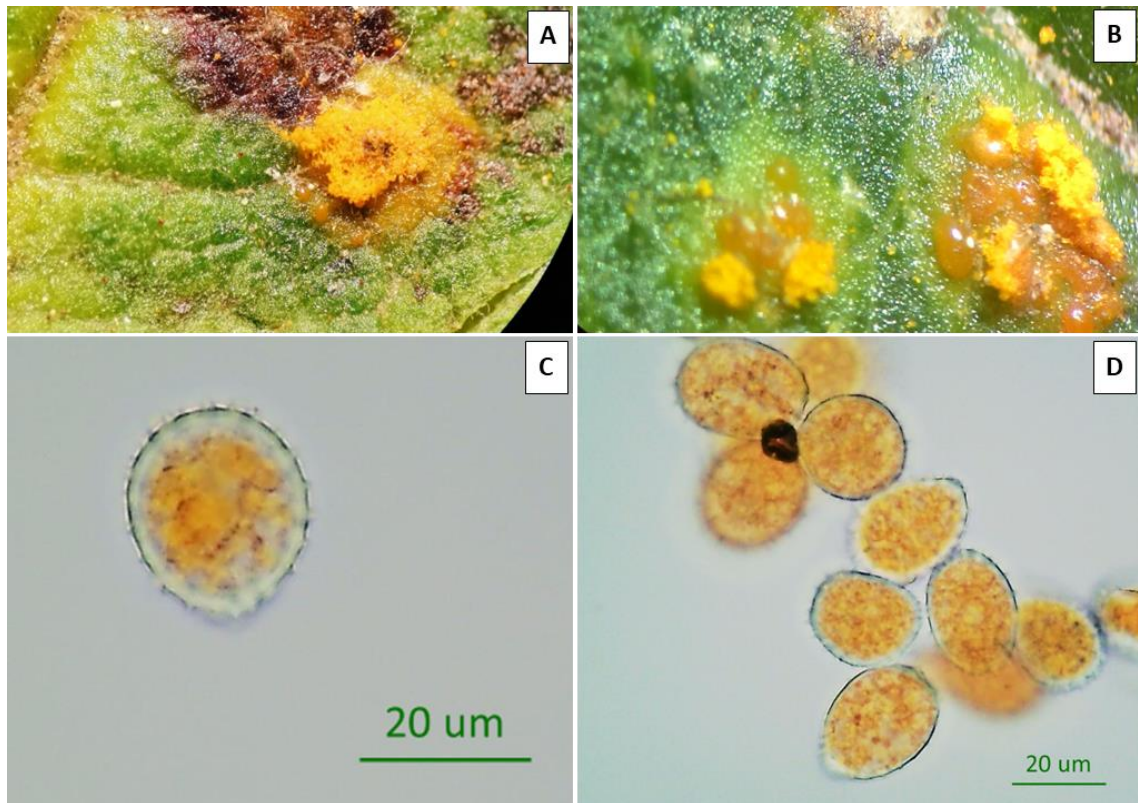


Figura 5. Pústulas (A) y soros (B) de roya en hojas de zarzamora observadas con un microscopio estereoscopio y Uredosporas observadas con microscopio óptico a 40 x (C y D). Fotografías propias (López-Vásquez, 2022).

Uredosporas unicelulares se observaron, de forma abovoide-globosa, generalmente de pedicelos largos; en las preparaciones, en los episporios se observan hialinas, uniformemente equinuladas con espinas cónicas (Figura 6B). El tamaño de las uredosporas varió entre 9 a 16 μm de ancho y 13 a 25 μm de largo. La base de las espinas fue de 0.6-1.8 μm con 0.8-2.4 μm de alto.

Los resultados de las mediciones de las uredosporas mediante Microscopia Binocular Biológico indican que van de 15-24 μm de ancho y 17-32 μm de largo. También se pudo observar en las uredosporas la presencia de una depresión en la base de las espinas rodeada de un anillo grueso irregular y entre los anillos una serie de arrugas distribuidas por toda la uredospora (Figura 6C-D).

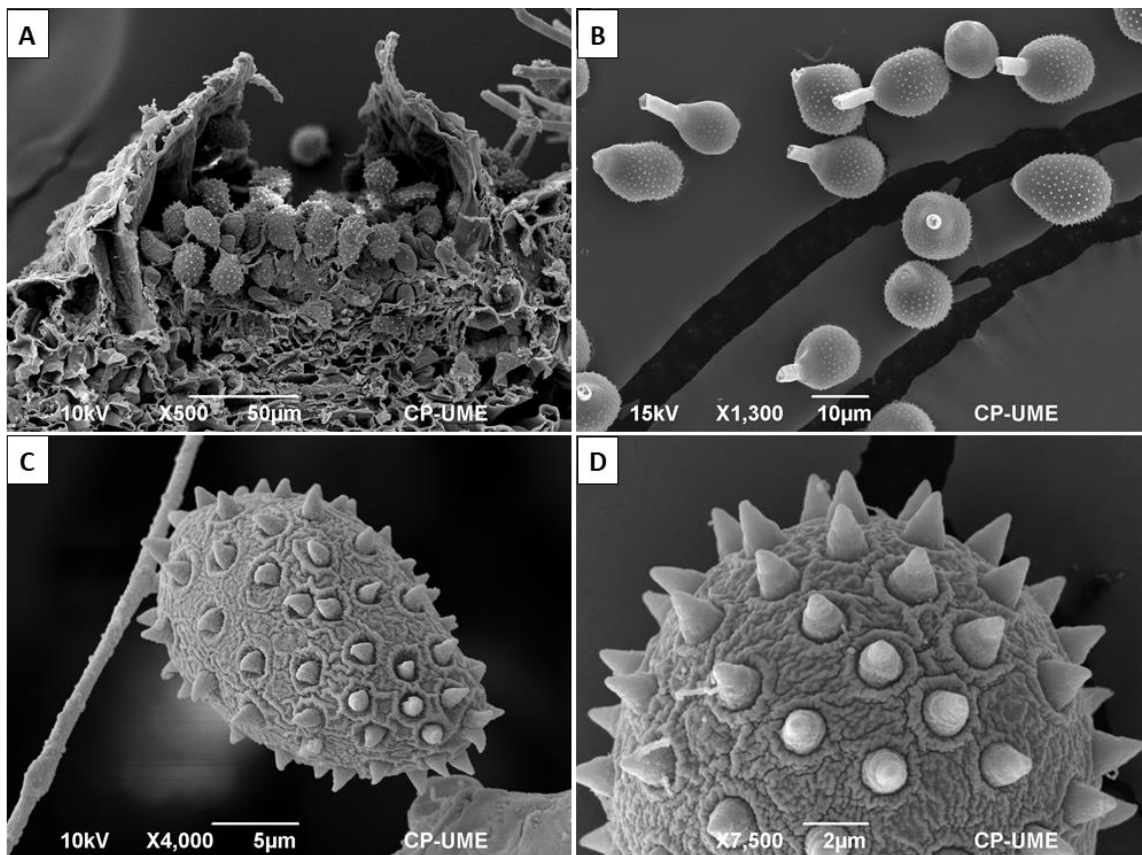


Figura 6. Soro con uredosporas (A) y uredosporas con pedicelos (B), uredospora abovoide-globosa (C) y episporios equinuladas con espinas cónicas (D). (Figura cortesía de Rosas-Saito y Solano-Vidal, 2022).

2.5.2. Identificación molecular de la roya

En las condiciones descritas en el presente trabajo se logró amplificar la región intergénica ITS2 y observada en un gel de agarosa al 2 % obteniendo los 600 pares de bases (Figura 7).

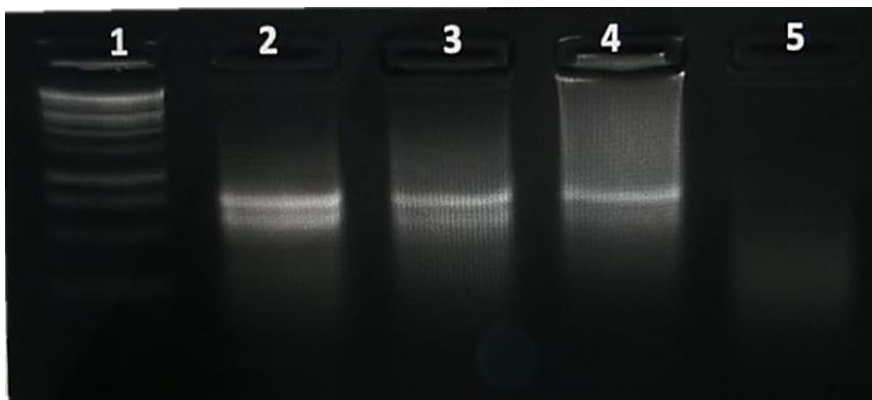


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa de ITS 1 y 4. Marcador de 1kb Promega (1), muestra RZSM20 (2), muestra RZSM20 (3), control positivo (4) y control negativo (5).

Los resultados de la comparación entre la secuencia de roya obtenida y la base de datos en el programa BLAST, indicaron que se tiene un porcentaje de identidad de 85.13 % con *Kuehneola uredinis*.

El análisis filogenético construido por el método de Máxima Verosimilitud con 6 secuencias obtenidas de la base de datos del NCBI, indicó que la secuencia de roya de zarzamora silvestre (RZSM20) forma un clado con 100 % de probabilidad con especies de *Kuehneola uredinis* y 55 % con especies de *Arthuriomyces peckianus* (Figura 8).

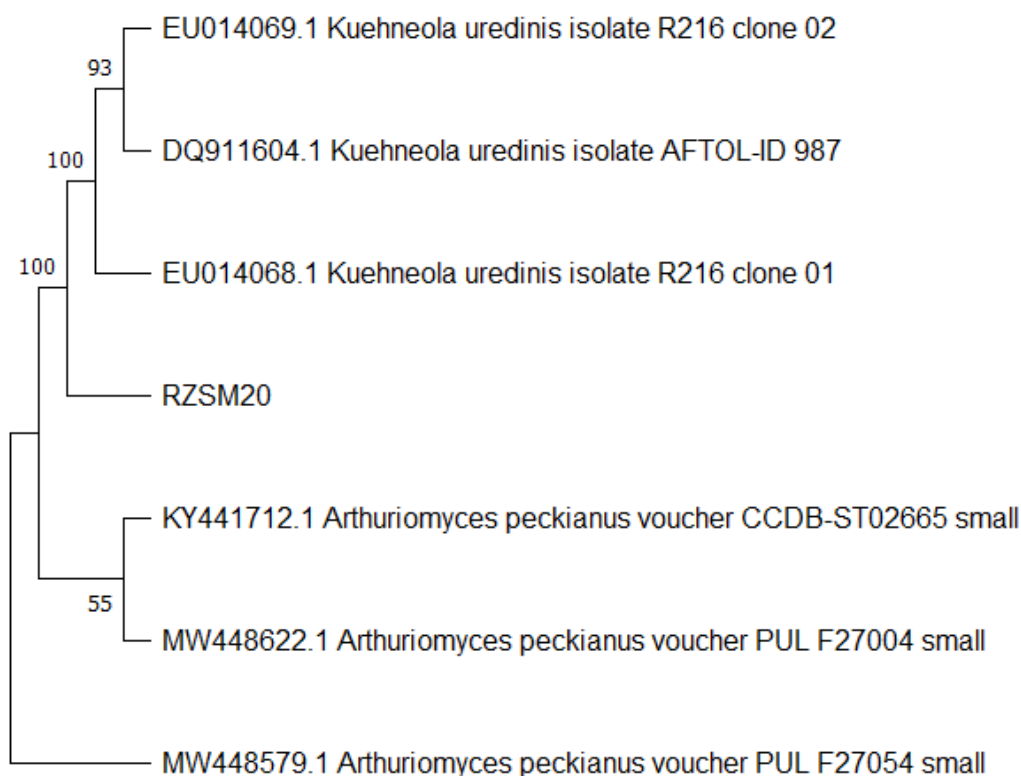


Figura 8. Análisis filogenético de ITS de la roya aislada de plantas de zarzamora silvestre por el método de máxima verosimilitud con 1000 bootstrap.

2.6. DISCUSIÓN

La caracterización morfológica obtenida en el presente trabajo es comparable con las descripciones y medidas reportadas por Shands *et al.* (2018), Rodrigues *et al.* (2021) y Marín *et al.* (2022) quienes han identificado la especie *Kuehneola uredinis* (Link) Arth. Estos autores coinciden en que los principales síntomas de *K. uredinis* en plantas de zarzamora son formación de pústulas en hojas y tallos, mayor incidencia en hojas avejentadas, pústulas de color amarillo-anaranjado brillante, manchas necróticas-marrón sobre el haz. Estos síntomas también coinciden con la caracterización morfológica de las pústulas de roya observadas en hojas denominada: muestra RZSM20.

Las medidas de las pústulas de la muestra RZSM20 (131-249 x 224-458 μm) se encuentra dentro del rango reportado por Shands *et al.* (2018), quienes refieren pústulas de *Kuehneola uredinis* de 100 - 400 μm , y por Marín *et al.* (2022) quienes reportaron medidas de 90 - 320 μm . Las medidas de las uredosporas de la muestra RZSM20 fueron de 17-32 x 15-24 μm , las cuales se encuentran dentro del rango reportado por Shands *et al.* (2018) quienes describen uredoporas de 28-40 x 24-32 μm y por Rodrigues *et al.* (2021) con medidas de 20-25 x 15-20 μm , además de las de Marín *et al.* (2022) con 24-36 x 22-30 μm . Con respecto a la equinulación de las uredosporas, Shands *et al.* (2018) reportó medidas de 1.0 a 1.5 μm de espesor, lo que coincide con las medidas de la muestra RZSM20 que presentó 0.8 - 2.4 μm .

La caracterización morfológico-molecular de la roya presente en poblaciones silvestres de zarzamora en las zonas de colecta de Hidalgo y Puebla, que confirman la identidad de *Kuehneola uredinis*, conforma el primer antecedente sobre la etiología de este patógeno en México y sin duda, una referencia para posteriores estudios en este país.

2.7. CONCLUSIÓN

De acuerdo con los resultados obtenidos en la presente investigación, el agente causal de la roya en plantas de zarzamora silvestre se ha identificado morfológica y molecularmente como *Kuehneola uredinis*, patógeno considerando dentro de las tres principales royas que afectan al cultivo de zarzamora.

2.8. LITERATURA CITADA

- Alejos VLP, Aragón MM del C y Cornejo RA. 2014. Herramientas Moleculares aplicadas en Ecología: Aspectos Teóricos y Practicas; Extracción y Parificación de ADN. Primera Edición. México. 1-25 p. ISBN: 978-607-8246-72-4
- BancoADN. 2020. Programa de control de calidad de ácidos nucleicos. Banco Nacional de ADN. Carlos III (Universidad de Salamanca). www.bancoadn.org (consulta, marzo 2021).
- Cristancho AM, Escobar OC y Ocampo JD. 2007. Evolución de razas de *Hemileia vastatrix* en Colombia. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Chinchiná, Caldas, Colombia. 58(4):340-359.
- Clark JR and Finn CE, 2014. Blackberry Cult Ivat Ion in the World. Revista Brasileira Fruticultura. 36 (1):046 -057. <https://doi.org/10.1590/0100-2945-445/13>
- Gauthier N and Sayre J. 2021. Rust Diseases of Brambles. Plant Pathology Fact Sheet. University of Kentucky. College of Agriculture, Food and Environment. PPFS-FR-S-06. 1-5.
- León GHM. 2016. Morfología y Taxonomía de Urediales (Royas) en México. 29 p. <https://es.slideshare.net/AcademiaDeIngenieriaMx/morfologa-y-taxonomia-de-uredinales-royas-en-mxico> (consulta, agosto 2021).
- Lessa EP, Tomasco IH, D'Anatro A. 2015. Análisis filogenético. Departamento de Ecología y Evolución. Facultad de Ciencias. Universidad de la República. Uruguay. 30 p.
- Marín MV, Seijo TE, Druffel K, Deng Z and Peres NA. 2022. First Report of Leaf Rust on Blackberry (*Rubus* spp.) Caused by *Kuehneola uredinis* in Florida. The American Phytopathological Society. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-21-2580-PDN>
- Molinas M y Fontarnau R. 1976. Estudio de las Esporas de *Uromyces Caryophyllinus* (Schr.) Wint. al Microscopio Electrónico de Barrido, SEM. Microscopia Electrónica de la Universidad de Barcelona. 19 p.
- Pérez VES. 2020. Variabilidad genética de *Hemileia vastatrix* (Berk. & Br.) en Zonas Cafetaleras del Estado de Veracruz, México. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Autónoma Chapingo. 62 p.
- Rodrigues VF, de Castro MH, Pontes SHM, Teixeira FCM and Teixeira de OI. 2021. First report of *Kuehneola uredinis* (Link) Arthur infecting blackberry in Brazil. Saudi Journal of Biological Sciences 28(12):6815-6817. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.07.057>
- Serrato DA, Flores RL, Aportela JC y Sierra PE. 2014. Herramientas Moleculares aplicadas en Ecología: Aspectos Teóricos y Practicas; PCR: Reacción en

- Cadena de la Polimerasa. Primera Edición. México. 53-73 p. ISBN: 978-607-8246-72-4
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2021. Panorama Agroalimentario. México. Edición del año 2021:143-144
- Shands AC, Grandall SG and Miles TD. 2018. First report of leaf rust on California Blackberry (*Rubus ursinus*) caused by *Kuehneola uredinis* in California. Plant Disease 102(3):682-682.
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. PCR protocols: A Guide to Methods and Applications. San Diego, Academic Press 31:315-322.
- Zuluaga C, Buritica P y Marin M. 2010. Filogenia de hongos roya (Uredinales) en la zona andina colombiana mediante el uso de secuencias del ADN ribosomal 28S. Revista Biología Tropical 59(2):517-540. ISSN-0034-7744

CAPITULO III. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LOS HIPERPARÁSITOS DE LAS ROYAS DE *Rubus* sp. SILVESTRE EN LOCALIDADES DE HIDALGO Y PUEBLA

3.1. RESUMEN

La presencia de pústulas de la hoja con crecimiento de un hiperparásito asociado con la incidencia de roya (*Kuehneola uredinis* L.) en plantas de zarzamora silvestre en localidades de Hidalgo y de Puebla abre posibilidades para estudio sistemático de caracterización del hiperparásito como preámbulo de trabajos sobre control biológico de la roya en el cultivo de zarzamora. El hiperparásito presentó crecimiento abultado, setas septadas de color marrón y conidios. Se obtuvieron dos cepas en medio de cultivo PDA (HRZB41 y HRZA18), las colonias tenían en común coloración oscura, micelio sumergido y pigmentación en el medio de cultivo. La identidad de la especie se confirmó mediante la secuenciación directa de la región intergénica. Los resultados indicaron que la muestra HRZB41 presentó un porcentaje de identidad de 100 % con *Boeremia exigua* var. *exigua* y la muestra HRZA18 99.61 % con *Didymella glomerata*. La relación filogenética de las secuencias obtenida se determinó utilizando el programa MEGA11. Estos dos hiperparásitos aislados de *Kuehneola uredinis* en zarzamora silvestre se reportan por primera vez.

Palabras clave: *Kuehneola uredinis* L., *Rubus* sp., hiperparásito, ITS, *Boeremia exigua* var. *exigua*, *Didymella glomerata*.

Tesis de Maestría en Ciencias en Protección Vegetal, Universidad Autónoma Chapingo

Autor: Erida Yasmin López Vásquez

Director de Tesis: Dr. Dimas Mejía Sánchez

3.2. ABSTRACT

The presence of leaf pustules with growth of a hyperparasite associated with the incidence of rust (*Kuehneola uredinis* L.) in wild blackberry plants in Hidalgo and Puebla, opens possibilities for a systematic study of the characterization of the hyperparasite as a prelude to works on Biological control of rust in blackberry cultivation. The hyperparasite presented bulky growth, septate brown setae and conidia. Two strains were obtained in PDA culture medium (HRZB41 and HRZA18), the colonies had in common dark coloration, submerged mycelium and pigmentation in the culture medium. Species identity was confirmed by direct sequencing of the intergenic region. The results indicated that the HRZB41 sample presented an identity percentage of 100% with *Boeremia exigua* var. *exigua* and the sample HRZA18 99.61% with *Didymella glomerata*. The phylogenetic relationship of the obtained sequences was determined using the MEGA11 program. These two hyperparasites isolated from *Kuehneola uredinis* in wild blackberry are reported for the first time.

Keywords: *Kuehneola uredinis* L., *Rubus* sp., hyperparasite, ITS, *Boeremia exigua* var. *exigua*, *Didymella glomerata*.

Tesis, Universidad Autónoma Chapingo

Author: Erida Yasmin López Vásquez

Advisor: Dr. Dimas Mejía Sánchez

3.3. INTRODUCCIÓN

La roya causada por *Kuehneola uredinis* L. identificada en cultivos de zarzamora (*Rubus* sp.) es una enfermedad devastadora que daña tallos y hojas, capaz de afectar aproximadamente el 90 % de las hojas de las plantas (Cheon *et al.*, 2013).

Los daños ocasionados por las royas en diversos cultivos se reflejan en el rendimiento y las ganancias. Los métodos actuales de control de la roya incluyen fungicidas, cultivos resistentes y prácticas agronómicas preventivas. Algunos hiperparásitos son antagonistas de patógenos de plantas y pueden proporcionar un método potencial de control biológico contra cepas de roya cada vez más virulentas. Sobre el mecanismo de inhibición del crecimiento de la roya por parte de los hiperparásitos poco se sabe; sin embargo, el aislamiento de nuevas cepas y su posterior caracterización pueden revelar nuevas estrategias de tratamiento para el control de la roya (Wilson *et al.*, 2020).

Un ejemplo importante sobre este tema es de la exploración de *Sphaerellopsis filum* (forma sexual *Eudarluka caricis*) como agente de biocontrol de royas. Este organismo se encuentra en una amplia gama de royas, entre ellas *Phragmidium violaceum* agente causal de la roya en zarzamora (Yuan *et al.*, 1998; Trakunyingcharoen *et al.*, 2014). Debido a que el control de la roya con fungicidas tiene un impacto de riesgo en el medio ambiente, existe una gran necesidad de un antagonista natural. Por lo tanto, el presente estudio se centró en el aislamiento, caracterización morfológica y molecular de los hiperparásitos asociados con plantas de zarzamora silvestre con potencial antagónico para hongos de la roya.

3.4. MATERIALES Y MÉTODOS

3.4.1. Aislamientos de hiperparásitos de la roya

En laboratorio, las muestras de hojas de zarzamora con roya se observaron bajo un microscopio estereoscópico OLYMPUS® para examinar si las pústulas se encontraban parasitadas. Al detectar al hiperparásito sobre las pústulas se realizaron pequeños cortes con una navaja delgada DORCO® cuidando de llevar tejido de hoja y del hiperparásito. Bajo condiciones asépticas los tejidos fueron lavados con hipoclorito de sodio (NaClO) al 1.5 % durante 2 min, posteriormente se lavaron dos veces con agua destilada esterilizada por 2 min y secadas en toallas de papel SANITA®. Las muestras se colocaron en cajas Petri con medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA) y llevadas a incubación (Incubadora Memmert) a 22 °C hasta que se observara crecimiento de micelio (Yuan *et al.*, 1998).

3.4.2. Purificación y resguardo de las cepas

A los cultivos se les monitoreó constantemente durante su incubación hasta observar crecimiento de micelio. Las colonias en crecimiento provenientes de los cortes se transfirieron a otra caja Petri con medio de cultivo PDA. Para ello, mediante sacabocados estéril se realizó un corte de micelio y con una aguja de disección se transfirió a la nueva caja Petri. Finalmente, las cepas obtenidas se purificaron mediante cultivos monospóricos por colonia siguiendo la metodología de Cañedo (2004).

3.4.3. Caracterización morfológica del hiperparásito

La caracterización morfológica se realizó mediante la observación de preparaciones semipermanentes con un Microscopio Binocular Biológico Cx-31 OLYMPUS®. Cortes muy pequeños se obtuvieron siguiendo la metodología utilizada durante los aislamientos, posteriormente se colocaron sobre un portaobjetos que contenía una gota de azul de lactofenol y se le colocó un cubreobjetos. Se buscaron estructuras morfológicas para la identificación del hiperparásito. Para las mediciones y fotografías se utilizó una cámara

microscópica digital MC500-W tercera generación, vinculada al programa MicroCapture Pro y un microscopio Electrónico de Barrido y operado a 10 Kv (JSM-6390/LGS; Jeol, Tokyo, Japón) de la Unidad de Microscopia Electrónica del Colegio de Posgraduados. Las preparaciones se guardaron para su uso posterior.

La caracterización de los hiperparásitos se realizó tomando como referencia las características descritas en las publicaciones de Aveskamp *et al.* (2010), Chen *et al.* (2015), Michel *et al.* (2017). La forma de los conidios se describió tomando como referencia la guía de los hongos descrita por Moreno y Manjón (1986).

3.4.4. Identificación molecular del hiperparásito

La extracción de ADN se realizó siguiendo el protocolo Dellaporta Mini (Dellaporta *et al.*, 1983) con modificaciones para ser utilizado en hongos; se utilizaron cepas con crecimiento activo de aproximadamente 4 días en medio de cultivo PDA. Con una espátula de acero inoxidable estéril se realizó un raspado de micelio y se depositó en morteros esterilizados, previamente congelados a una temperatura de -70 °C. Para macerar la muestra se adicionó 1 mL de buffer de lisis (Urea 3M; NaCl 0.35 M; Tris 0.05 M; EDTA 0.02 M y 1 % Sarcosina). Una vez maceradas se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL y se conservaron a -70 °C por 30 minutos. Pasado el tiempo, las muestras se descongelaron y se agitaron con ayuda de un Vortex durante un minuto, posteriormente se centrifugó a una velocidad de 12000 rpm por un minuto. El sobrenadante se colocó en un tubo Eppendorf nuevo. Para la limpieza de las muestras se agregó 2 µL de ARNasa PROMEGA A7973, inmediatamente se incubaron a 37 °C por 20 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se le adicionaron 500 µL de fenol cloroformo (12:4), se mezclaron ejerciendo cinco vueltas de campana y se centrifugaron a 12 000 rpm durante tres minutos. El contenido del tubo se dividió, la fase acuosa se recuperó en un tubo Eppendorf nuevo y el resto se eliminó. Posteriormente, cada muestra se precipitó con 500 µL isopropanol y 50 µL de acetato de sodio (10 M) e incubados por 8 minutos en frío. Una vez transcurrido el tiempo, las muestras se volvieron a centrifugar durante 10 minutos a 12 000

rpm; al sacar las muestras se observó en algunas de ellas una pastilla (ADN). El sobrenadante se eliminó cuidadosamente. La pastilla se lavó con 50 μL de etanol al 70 % y se centrifugó a 12 000 rpm por cinco minutos, y nuevamente se eliminó el sobrenadante. Finalmente se adicionaron 50 μL de agua grado PCR. Las muestras se conservaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

La calidad del ADN se verificó mediante una prueba de electroforesis en geles de agarosa al 1 %, teñido con el buffer de carga (5x Green GoTaq M891A). En conjunto se verificó la concentración y pureza de ADN mediante espectrofotometría, utilizando un NanoDrop marca Quawell UV Spectrophotometer Q3000 (BancoADN, 2020).

Secuenciación del ITS 2

La amplificación de la región intergénica 2 se realizó mediante Reacciones en Cadena de Polimerasa (PCR); se utilizaron los iniciadores ITS (TCCGTAGGTG AACCTGCG); (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (Wei *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2020).

La reacción de amplificación se preparó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL de acuerdo con las concentraciones indicadas en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Reactivos y concentraciones utilizadas en una reacción de PCR para cepas de hiperparásito.

Reactivos	Concentración [INICIAL]	Concentración [FINAL]	Reacción (25 μL)
Buffer	5X	1X	5 μL
dNTP's	10 mM	0.2 mM	0.5 μL
MgCl ₂	25 mM	2 mM	2.5 μL
ITS 1	10 ng· μL^{-1}	10 mM	0.5 μL
ITS 4	10 ng· μL^{-1}	10 mM	0.5 μL
GoTaq DNA polimerasa	5 U· μL^{-1}	2 U/reacción	0.4 μL
Agua grado PCR	n/a	n/a	13.6 μL
ADN		50 ng/ μL^{-1}	2 μL

Las reacciones preparadas fueron colocadas en un termociclador con las condiciones de amplificación reportada por Serrato *et al.* (2014) para ITS: una etapa de desnaturalización inicial de 95 °C por 3 min, seguido de 34 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 59 segundos, alineamiento a 51.2 °C por 59 segundos y una extensión a 72 °C por 3 min; y un paso final de extensión a 72 °C por 8 min. Los productos de amplificación se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2 %. Por último, para secuenciar las reacciones se enviaron al Laboratorio de la compañía MacroGen © Korea.

Análisis de las secuencias

Las secuencias se editaron utilizando el programa Chromas 2.6.6 y ensambladas con DNASTAR Lasergene. Posteriormente se compararon en BLAST, el Banco de Genes del Centro Nacional de Biotecnología (GenBank NCBI USA) para obtener información disponible de secuencias con un alto porcentaje de similitud y cobertura. Por último, se elaboró un árbol filogenético utilizando el programa MEGA 11 (64-bit) utilizando 12 especímenes, 10 de ellos se obtuvieron del GenBank.

3.5. RESULTADOS

3.5.1. Hiperparásitos sobre pústulas de roya

Sobre las pústulas de roya examinada en hojas de zarzamora silvestre se observó el crecimiento de un hiperparásito de color oscuro (Figura 9A). Inicialmente presentó color gris, setas con conidios en sus terminaciones (Figura 9B). En las pústulas avejentadas con pocas uredosporas, el hiperparásito presentó color oscuro-marrón, aumentó la cantidad de setas (Figura 9C). En algunas hojas se observó una mancha de color marrón-rojizas alrededor de la pústula.

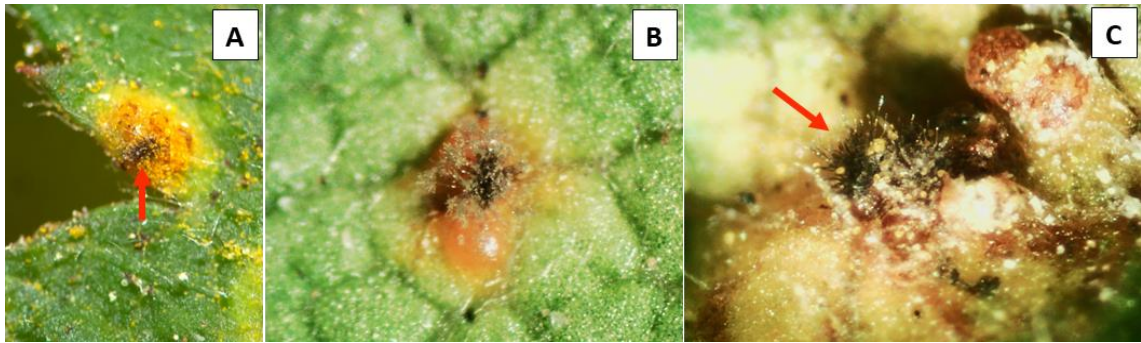


Figura 9. Hiperparásito sobre una pústula de roya (A), setas en un soro (B) y setas avejentadas invadiendo la pústula (C). Fotografías propias (López-Vásquez, 2022).

El hiperparásito presentó crecimiento abultado sobre las pústulas (Figura 10A-B), la principal característica para identificarlas sobre la roya son las setas septadas de color marrón (Figura 10C), con un tamaño promedio de 4.4 μm de grosor y 74.8 μm de largo. En algunos cortes se observó la presencia de conidios solitarios distribuidos sobre las setas. Los conidios se describieron de forma citriformes, elipsoidales a subglobosos, son hialinos, lisos, no presentan septos, ocasionalmente presentan 1 septo, los rangos de su tamaño van de 3.4 - 14 μm de largo y 2.4 - 5.5 μm de ancho.



Figura 10. Cortes de tejido de hoja de zarzamora con pústula de roya e hiperparásito a 10 X (A y B) y 40 X (C). Fotografías propias (López-Vásquez, 2022).

3.5.2. Caracterización morfológica de las cepas de hiperparásito

De los aislamientos de tejido incubados en medios de cultivo PDA se obtuvieron dos cepas con características similares a lo observado en hojas, estas cepas se etiquetaron como HRZB41 y HRZA18.

Cepa HRZB41

Presentó micelio blanco durante los primeros días, posteriormente toda la cepa cambio a un color oscuro. En el anverso de la caja Petri mostró coloración oscura, la forma de la periferia fue irregular con un margen ligeramente ondular, se observó poco micelio aéreo. En el reverso se pigmentó de color oscuro. El medio de cultivo mostró pigmentación negra y crecimiento de micelio sumergido. Hifas septadas de color marrón, muy parecidos a la morfología observada en preparaciones realizadas con el hiperparásito extraído de las hojas (Figura 11A).

Cepa HRZA18

Color marrón-oscuro en el anverso, en la periferia se observó color más claro, con poco micelio aéreo, la forma de la cepa fue circular con un margen entero. En el reverso se pigmentó de color negro. El medio de cultivo presentó pigmentación oscura y crecimiento de micelio sumergido. Las hifas fueron septadas de color marrón, no se observó la presencia de conidios (Figura 11B).

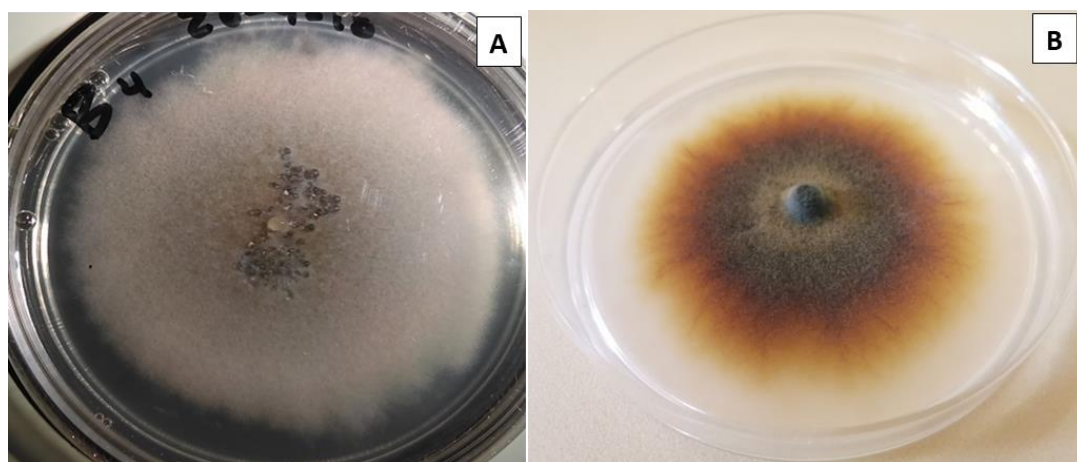


Figura 11. Colonia del aislamiento HRZB41 (A) y colonia del aislamiento HRZA18 (B). Fotografías propias (López-Vásquez, 2022).

3.5.3. Identificación molecular del hiperparásito

El gen reportado para el espacio intergénico para hongos se logró amplificar, mostrando una banda de 600 pb (Figura 12).

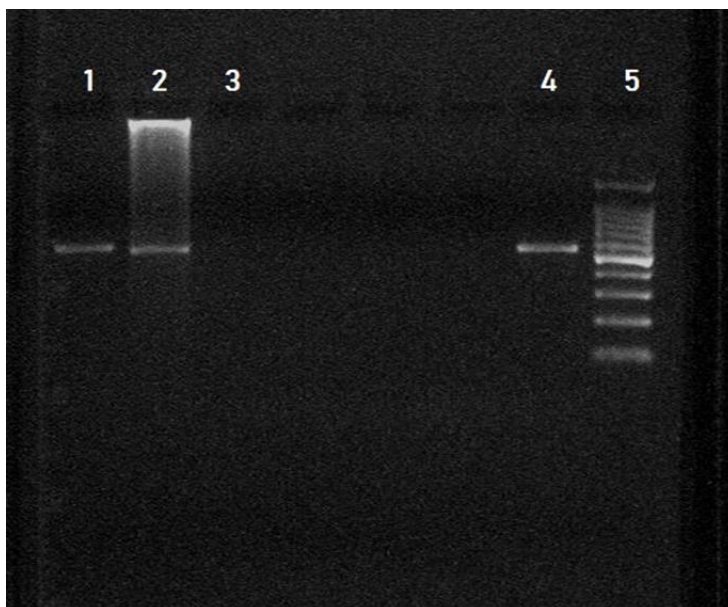


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa de ITS 1 y 4. Muestra HRZB41 (1), Control positivo (2), Control negativo (3), Muestra HRZA18 (4), Marcador de 1kb Promega (5).

Los resultados de la comparación de secuencias en la base de datos del BLASTn del GenBank indicaron que la muestra HRZB41 tuvo un porcentaje de identidad de 100 % con *Boeremia exigua* var. *exigua* y la muestra HRZA18 presentó un porcentaje de identidad de 99.61 % con *Didymella glomerata*.

El árbol filogenético construido por el método de Máxima Verosimilitud con 10 secuencias obtenidas de la base de datos del NCBI (Figura 13), permitió apreciar que los especímenes secuenciados etiquetados como HRZB41 y HRZA18 tuvieron una probabilidad de 60 % de compartir algún tipo de relación. Ambas especies formaron un clado, mostrando una relación filogenética con otros clados que agrupan a especies de *Didymella* (*glomerata* y *cinencis*).

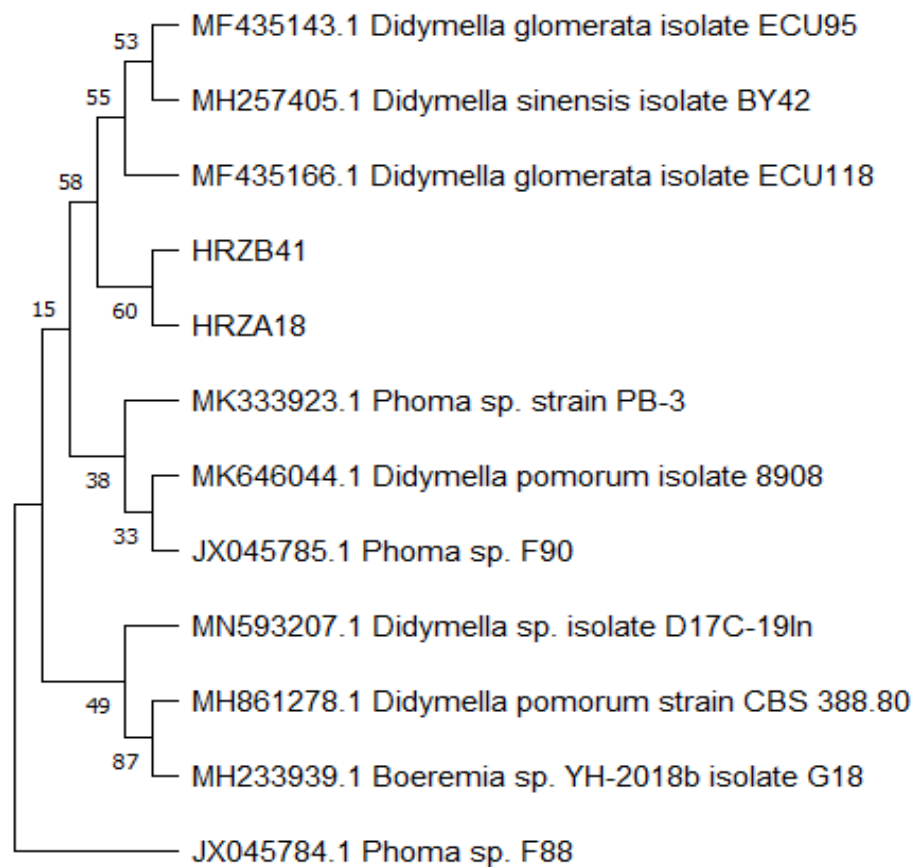


Figura 13. Análisis filogenético de ITS de hiperparásitos por el método de Máxima Verosimilitud con 1000 bootstrap.

3.6. DISCUSIÓN

El crecimiento del hiperparásito se caracteriza por la presencia de setas de color gris-marrón y manchas de color marrón-rojizas, esto coincide con la descripción que realizaron Michel *et al.* (2017) para *Boeremia exigua* var. *exigua* quienes reportan lesiones necróticas marrones que contenían picnidios negros, en hojas y tallos. También Pan *et al.* (2018) observaron numerosos picnidios granulares negros en la superficie de los tejidos enfermos en su identificación de *Didymella glomerata*.

La descripción microscópica destaca que el hiperparásito presenta setas septadas y se encuentran sobre las uredosporas de la roya, su color característico va de gris a marrón y sus conidios son de forma citriformes, elipsoidales subglobosos, hialinos, ocasionalmente presentará 1 septo, regularmente son aseptados, esta caracterización coincide con la reportada por Michel *et al.* (2017) quienes identificaron a *Boeremia exigua* var. *exigua* describiendo esporas expulsadas de picnidios translúcidos, bigutulados, estrechos a ligeramente curvados, de forma elipsoide. Sin embargo, en las medidas de los conidios se observó una pequeña variación, Michel *et al.* (2017) reportaron tamaños de $4 - 7 \times 1.5 - 3 \mu\text{m}$ y la obtenidas en este trabajo van de $3.4 - 14 \times 2.4 - 5.5 \mu\text{m}$, lo que indica que se encuentran dentro del rango, aunque en la presente investigación se obtuvieron conidios más grandes. Aveskamp *et al.* (2010) y Chen *et al.* (2015) también describen características similares al caracterizar a *Boeremia exigua* con conidios de forma variable, hialinos, de paredes lisas y delgadas, principalmente aseptados, pero regularmente se pueden encontrar conidios más grandes con 1 o 2 septos. Sin embargo, estas características también coinciden con la descripción de la especie *Didymella* por Chen *et al.* (2015), quienes describen a los conidios de forma variable, es decir, de elipsoidales a subglobosas, cilíndricos, oblongos, ovoides, generalmente aseptados, de paredes lisas y delgadas, hialinos.

La caracterización morfológica de las cepas del hiperparásito coincidió con lo descrito por Aveskamp *et al.* (2010), quienes mencionan a *Boeremia exigua* var. *exigua* como colonias de margen regular, con micelios sumergidos en el medio de cultivo, el anverso de color negro oliváceo a gris y el inverso color negro, aunque los colores de la cepa en el presente estudio fueron más oscuras y no oliváceo, lo que puede explicarse por el medio de cultivo diferente que se utilizó. Las cepas inicialmente presentaron coloración blanca y posteriormente se tornó a un color oscuro marrón, lo que coincide con la morfología de las cepas obtenidas por Pan *et al.* (2018) para la especie *Didymella glomerata*.

El aislamiento HRZB41 del hiperparásito reflejó 100 % de identidad con *Boeremia exigua* var. *exigua*, especie sinónimo de lo que anteriormente se conocía como *Phoma exigua* var. *exigua* (Aveskamp et al., 2010). El aislamiento HRZA18 presento un porcentaje de identidad de 99.61 % con *Didymella glomerata*. Las dos especies, *Boeremia exigua* var. *exigua* y *Didymella glomerata* pertenecen a la familia *Didymellaceae*, la cual se estableció en 2009 para acomodar a *Didymella* y varios géneros con morfología similar a *Phoma* (Chen et al., 2015). El resultado del árbol filogenético elaborado con las secuencias HRZB41 y HRZA18 se agruparon en un clado compartiendo 60 % de probabilidad de que exista relación entre las especies, además, comparten filogenia con especies agrupadas de *Didymella*.

Autores que han trabajado con las especies que integran a la familia de las *Didymellaceae* indican que las características morfológicas asexuales relativamente simples de estas especies no proporcionan distinciones suficientes para delimitación de especies, comparten características morfológicas como la forma y dimensiones de sus conidios. Por otra parte, las asociaciones hongos-hospedante no están claramente definidas, por lo que es posible que estas especies se presenten en plantas silvestres de zarzamora (Chen et al., 2015).

No se encontraron informes de hiperparásitos pertenecientes a la familia de las *Didymellaceae*, sin embargo, autores como Yuan et al. (1998) y Płachecka (2005) han identificado a *Eudarluka caricis*, el teleomorfo de *Sphaerellopsis filum*, como hiperparásito asociado con más de 369 especies de roya pertenecientes a 30 géneros en más de 50 países, incluyendo a la roya de la zarzamora (*Phragmidium violaceum*). *E. caricis* pertenece al orden Pleosporales, al cual también pertenece la familia *Didymellaceae*. En su investigación, Sandoval y Lopez (1990) detectaron una especie no identificada de *Phoma* en soros de *Puccinia melanocephala*. Estos antecedentes publicados permiten aseverar que el aislamiento e identificación morfológica y molecular, así como su relación filogenética de *Boeremia exigua* var. *exigua* y *Didymella glomerata* pueden ser nuevos hiperparásitos asociados con la roya de zarzamora silvestre de

poblaciones naturales encontrados en algunas localidades de Hidalgo y de Puebla y que en este estudio se identificó como *Kuehneola uredinis*. Sin duda, este hallazgo constituye una materia prima esencial para posteriores trabajos sobre el manejo de los hiperparásitos que por primera vez se reportan como depredadores de *K. uredinis*.

3.7. CONCLUSIÓN

Morfológica y molecularmente se identificaron dos nuevos hiperparásitos en poblaciones de roya (*K. uredinis*) en plantas silvestres de zarzamora en localidades de Hidalgo y Puebla.

3.8. LITERATURA CITADA

- Aveskamp MM, de Gruyter J, Woudenberg JH, Verkley GJ and Crous PW. 2010. Highlights of the *Didymellaceae*: A polyphasic approach to characterise *Phoma* and related pleosporalean genera. *Studies in Mycology* 65:1–60. <https://doi.org/10.3114/sim.2010.65.01>
- BancoADN. 2020. Programa de control de calidad de ácidos nucleicos. Banco Nacional de ADN. Carlos III. Universidad de Salamanca. 10 p. <https://www.bancoadn.org/docs/programa-control-calidad-muestras.pdf> (consulta, marzo 2021).
- Cañedo VTA. 2004. Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos. Centro Internacional de la Papa (CIP), Perú. 62 p.
- Chen Q, Jiang JR, Zhang GZ, Cai L and Crous PW. 2015. Resolving the *Phoma* enigma. *Studies In Mycology* 82:137-217. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2015.10.003>
- Cheon W, Kim YS, Lee SG and Jeon YH. 2013. First report of cane and leaf rust on *Rubus fruticosus* caused by *Kuehneola uredinis* in Korea. *Plant Disease* 97(8): 1115.
- Michel VV, Daepf M, Woudenberg JHC, de Gruyter J and de Wit PJGM. 2017. First report of *Boeremia exigua* var. *exigua* causing stem and leaf spot on common speedwell in Switzerland. *Plant disease* 102(2):440. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-17-0677-PDN>
- Moreno G y Manjón JL. 1986. Guía de los hongos en la Península Ibérica. Editorial Omega. 1276 p.
- Dellaporta SJ, Wood J and Hicks JB. 1983. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1:19-21.
- Pan H, Chen MY, Deng L, Wang ZP, Li L and Zhong CH. 2018. First report of *Didymella glomerata* causing black spot disease of kiwifruit in China. *Plant Disease* 102(12):1-5. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-18-0583-PDN>
- Plachecka A. 2005. Microscopical observations of *Sphaerellopsis filum*, a parasite of *Puccinia recondita*. *Acta Agrobotanica* 58:67-71. DOI:10.5586/aa.2005.010
- Sandoval I and Lopez MO. 1990. New hyperparasites of the sugar-cane rust *Puccinia melanocephala*. *Journal Article* 49(2):20-26.
- Serrato DA, Flores RL, Aportela JC y Sierra PE. 2014. Herramientas Moleculares Aplicadas en Ecología: Aspectos Teóricos y Practicas; PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa 1:53-73.
- Sinclair CG y Cantero D. 1990. Fermentation Modelling. In: *Fermentation a practical approach* (B. McNeil and L. M. Harvey, Eds.). IRL Press at Oxford University Press, Oxford. 65 p.

- Trakunyingcharoen T, Lombard L, Groenewald JZ, Cheewangkoon R, Toanun C, Alfenas AC and Crous PW. 2014. Mycoparasitic species of *Sphaerellopsis*, and allied lichenicolous and other genera. IMA Fungus 5:391–414. <https://doi.org/10.5598/ima fungus.2014.05.02.05>
- Wang N, Fan X, Zhang S, Liu B, He M, Chen X, Tang C, Kang Z and Wang X. 2020. Identification of a Hyperparasitic *Simplicillium obclavatum* Strain Affecting the Infection Dynamics of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* on Wheat. Frontiers in Microbiology 11:1277. doi: 10.3389/fmicb.2020.01277
- Wei DP, Wanasinghe DN, Hyde KD, Mortimer PE, Xu J, Xiao YP, Bhunjun S and To-anun C. 2019. The genus *Simplicillium*. Mycokeys 60:69–92. doi: 10.3897/mycokeys.60.38040
- Wilson A, Cuddy WS, Park RF, Harm GFS, Priest MJ, Bailey J and Moffitt MC. 2020. Investigating hyperparasites as potential biological control agents of rust pathogens on cereal crops. Australasian Plant Pathology 49:231-238. <https://doi.org/10.1007/s13313-020-00695-8>
- Yuan ZW, Pei MH, Hunter T y Royle J. 1998. *Eudarluca caricis*, el teleomorfo del micoparásito *Sphaerellopsis filum*, sobre la roya de la mora *Phragmidium violaceum*. Mycological Research 102 (7):866-868. <https://doi.org/10.1017/S0953756297005832>

DISCUSIÓN GENERAL

Los estudios observacionales descriptivos, como el presente, tienen la finalidad de contribuir al conocimiento de cómo son o cómo se presentan los fenómenos naturales, en este caso para generar conocimiento sobre la caracterización de la identidad biológica de la roya que ataca poblaciones silvestres de zarzamora en algunos lugares de México como Hidalgo y Puebla, así como de la presencia de hiperparásitos depredadores de esta roya. El alcance de este conocimiento básico sobre el recurso genético fúngico no sólo permite saber cuáles son los agentes fitopatógenos locales actuantes en poblaciones naturales de zarzamora, y por qué están ahí, sino prospectar posibles acontecimientos de ocurrir la introducción de material mejorado en estas zonas considerando la tendencia que tiene el consumo nacional y de exportación de esta frutilla que podría motivar la explotación comercial en esas regiones.

Por otra parte, el hallazgo de dos hiperparásitos de *K. uredis* presente en poblaciones de plantas de zarzamora silvestre en algunos lugares de Hidalgo y de Puebla, abre expectativas importantes sobre el aprovechamiento de estos recursos genéticos para el biocontrol de enfermedades fúngicas en plantíos comerciales de zarzamora, por lo que la conformación de un banco de germoplasma de hiperparásitos podría ser útil, sobre todo en la perspectiva de ampliar estudios exploratorios de colecta de este tipo de organismos en otros lugares de México. Tanto la metodología seguida para identificación de hiperparásitos como el propio resultado de su existencia sobre el hongo causante de la roya en poblaciones naturales de zarzamora constituyen referencias de posteriores estudios, en ellos sobre colecta y manejo de organismos, filogenia y evolutivos.

CONCLUSIONES GENERALES

Con base a las características morfológicas e identificación molecular, el agente asociado con la roya en plantas de zarzamora silvestre en las localidades muestreadas en Hidalgo y en Puebla, es *Kuehneola uredinis* (Link) Arthur; también se identificaron dos especies de hiperparásitos asociados con el hongo que ocasiona la roya en plantas de zarzamora silvestre, ambos pertenecen a la familia de las *Didymellaceae*: *Boeremia exigua* var. *exigua* y *Didymella glomerata*.

RECOMENDACIONES

Realizar evaluaciones *in vitro* utilizando cámaras GERBOX e *in vivo* con plantas silvestres y comerciales para determinar si el hiperparásito tiene el potencial de ser utilizado como agente de control biológico para controlar roya en zarzamora y también se necesita investigación adicional para determinar si el hiperparásito es amigable con el medio ambiente.