



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO



DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

DETECCIÓN MOLECULAR DE *Peronospora sparsa* Berk
AGENTE CAUSAL DEL MILDIÚ DE LA ZARZAMORA Y
EVALUACIÓN DEL FOSFITO DE POTASIO PARA SU MANEJO
EN MICHOACÁN

KENIA JANET RODRÍGUEZ DÍAZ

TESIS



QUE PRESENTA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

Chapingo, México, Junio de 2011

**DETECCIÓN MOLECULAR DE *Peronospora sparsa* Berk
AGENTE CAUSAL DEL MILDIÚ DE LA ZARZAMORA Y
EVALUACIÓN DEL FOSFITO DE POTASIO PARA SU MANEJO
EN MICHOACÁN**

Tesis realizada por **Kenia Janet Rodríguez Díaz** bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobado por el mismo y aceptado como requisito parcial para obtener el grado de:

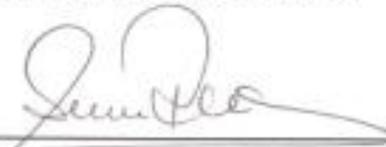
MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

DIRECTOR:



DR. ÁNGEL REBOLLAR ALVITER

CO-DIRECTORA:



DRA. HILDA VICTORIA SILVA ROJAS

ASESOR:



DR. GERARDO LEYVA MYR

Chapingo, México, Junio de 2011.

DEDICATORIA

A mi Madre; Esperanza Díaz Pineda

Con todo mi cariño y amor..

***Y a todos los productores y personas a quienes pudiera ser útil
el trabajo y esfuerzo realizado, para que nuestro campo
mexicano tenga un mejor futuro..***

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Autónoma Chapingo**, y especialmente al **Departamento de Parasitología Agrícola** que mediante la **Maestría en Protección Vegetal**, me dieron la oportunidad de cursar mis estudios de Postgrado.

Al Consejo **Nacional de Ciencia y Tecnología** (CONACYT) por el financiamiento otorgado para realizar mis estudios de Postgrado.

A mi Director de Tesis, Dr. Ángel Rebollar Alvíter, por su guía y apoyo, por darme las herramientas durante todo mi postgrado y fomentar en mi la motivación por seguir adelante.

A mi Codirectora de Tesis la Dra. Hilda Victoria Silva Rojas, por su ayuda tanto a nivel experimental así como por apoyarme en la elaboración de los manuscritos presentados y fomentar en mi la motivación por la investigación, así como en su apoyo y plena confianza en mi trabajo; sin duda, sin ellos no habría sido posible la realización de esta Tesis.

Al Dr. Gerardo Leyva Myr por su interés en el presente tema de investigación llevado a cabo y por su valiosa colaboración en el.

A todas las personas que componen el **Departamento de Protección Vegetal**, a todos los profesores, al Dr. Nahum Marban Mendoza por su instrucción y dedicación otorgados y por estar siempre dispuestos a ayudarnos.

Al **Centro Regional Universitario del Centro Occidente (CRUCO)** en Morelia, al Biólogo Ignacio López Cruz, al Ing. Juan Boyzo Marín, al Ing. Luis Miguel Miranda Gómez y a la Ing. María del Rosario Ramírez Mendoza por su valioso apoyo en el trabajo de campo y laboratorio, además de brindarme su valiosa amistad.

Al **Colegio de Posgraduados** por abrirme las puertas y brindarme todo el apoyo tanto en Equipo, como en material de consulta, así como a las personas que laboran en el Laboratorio de Biotecnología y Bioquímica de Semillas; Dra. Alejandrina Sra. Silvia, Sra. Martha, Ing. Liberia, Anita, Berenice, Don memo, Sr. Juan.

A mis inseparables compañeros de trabajo y amigos Andrés Aguilar, Oscar Daniel, Job Joel, Eli, Ema, y fuera de él, por esos momentos buenos y malos pero inolvidables. Así como también a J. Alfredo por su gran apoyo y cariño.

A mi madre y hermana, ellas son las personas que han hecho que hoy esté aquí y a quiénes debo en gran medida mi agradecimiento.

A todas las personas que de alguna manera favorecieron mi estancia en esta institución y este proyecto, y no menciono, ustedes saben que les agradezco de todo corazón.

DATOS BIOGRÁFICOS

KENIA JANET RODRÍGUEZ DÍAZ

Nació en Morelia Michoacán, el 22 de Julio de 1981. Realizó sus estudios de nivel medio superior en Morelia Michoacán. En el año 1999 ingreso a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y en el 2004 concluyó sus estudios satisfactoriamente de la Licenciatura en Biología. Realizó su servicio social en el Campus UNAM de Morelia en el Laboratorio de Ecología Genética. Su trabajo profesional lo inició en el Comité Estatal de Sanidad Vegetal del Estado de Michoacán en el año 2006.

En el año 2009 se incorporó al Programa de Postgrado en Protección Vegetal del departamento de Parasitología Agrícola, en donde realizó sus estudios para obtener el grado de Maestra en Ciencias en Protección Vegetal el 14 de Junio del 2011.

CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS.....	9
ÍNDICE DE FIGURAS.....	10
RESUMEN.....	14
ABSTRACT.	14
I. INTRODUCCIÓN.....	15
II. HIPÓTESIS	18
III. JUSTIFICACIÓN.....	19
IV. OBJETIVOS	19
4.1 Objetivo general.....	19
4.2 Objetivos específicos.....	19
V. REVISIÓN DE LITERATURA.....	20
5.1 Aspectos generales del cultivo de la zarzamora en México.	20
5.1.1 Origen y distribución de la zarzamora.....	20
5.1.2. Descripción del género Rubus (Tourn) L.....	21
5.1.3 Características botánicas de la zarzamora	22
5.1.4 Variedades cultivadas de zarzamora de mayor importancia en Michoacán	23
5.1.5 Especies silvestres de zarzamora en México	26
5.1.6 Requerimientos climáticos para el cultivo de zarzamora	27
5.1.7 Propagación de la zarzamora.....	27
5.2. Ciclo de crecimiento de la zarzamora	27
5.2.1 Cultivo de la zarzamora.....	29
5.3. Problemática del cultivo.	29
5.4. Aspectos fitosanitarios del cultivo de zarzamora	31
5.4.1 Plagas de mayor importancia.....	31

5.4.2 Principales Enfermedades.....	33
5.4.3 Virus	34
5.4.4 Bacterias.....	35
5.4.5 Malezas	37
5.5. El mildiú o secamiento del Berry de la zarzamora.....	37
5.6. Origen del Patógeno	38
5.6.1 Importancia, distribución y hospedantes	39
5.6.2 Descripción morfológica del agente causal	40
5.6.3 Signos y Síntomas.....	41
5.6.4 Ciclo de vida y epidemiología.....	43
5.6.5 Manejo Integrado de la enfermedad.....	44
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	47
6.1 Descripción de las áreas de estudio.....	47
6.2 Colecta de Material vegetal	48
6.2.1 Zarzamora cultivada.....	49
6.2.2 Material vegetal	49
6.2.3. Silvestre y plantas asociadas.....	49
6.3 Extracción de ADN.....	49
6.4 Cuantificación de ADN	51
6.5 Detección por PCR.....	52
6.6 Establecimiento de experimento en campo	54
6.7 Tratamientos y diseño experimental	55
6.8 Variables evaluadas.....	56
6.9 Análisis de datos	56
VII. RESULTADOS	57

7.1 Optimización del protocolo de detección del Oomycete.	57
7.2 Detección de <i>Peronospora sparsa</i> por PCR anidado en los diferentes Municipios, con diversos materiales vegetales.	58
7.3 Análisis Filogenético.....	67
7.4 Efectos de tiempos de aplicación de Fosfito de Potasio en la incidencia del Mildiú.....	68
7.5 Detección de <i>P. sparsa</i> en el experimento con fosfito de potasio.	69
VIII. DISCUSIÓN	72
IX. CONCLUSIONES.....	75
X. LITERATURA CITADA.....	76
ANEXOS.....	84

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Calendario de aplicaciones de Fosfito de potasio (Supa Active ®) sobre las diferentes etapas fenológicas del cultivo de zarzamora en una parcela comercial. **43**

Cuadro 2. Datos de las muestras colectadas en la primera fecha en el municipio de Ziracuaretiro indicando datos de los materiales vegetales así como su diagnóstico. **47**

Cuadro 3. Datos de las muestras colectadas de los diferentes municipios indicando datos de los diferentes materiales vegetales así como su diagnóstico. **49**

Cuadro 4. Datos de las muestras colectadas de los diferentes municipios indicando datos de los diferentes materiales vegetales así como su diagnóstico. **51**

Cuadro 5. Datos de las muestras colectadas de los diferentes municipios indicando datos de los diferentes materiales vegetales así como su diagnóstico. **53**

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Plantas de zarzamora <i>Rubus</i> sp. var. Tupy	13
Figura 2. Planta de zarzamora silvestre <i>Rubus adenotrichus</i> Schltdl.	14
Figura 3. Síntomas de <i>P. sparsa</i> . A. Distorsión de los tejidos con coloraciones rojizas en hojas. B. Manchas irregulares rojizas en la epidermis, pérdida de brillo, maduración prematura, partición de los frutos de <i>Rubus</i> sp.	30
Figura 4. Localización geográfica de las zonas de estudio Ziracuaretiro, Los Reyes, Tacámbaro y Ario de Rosales	36
Figura 5. Proceso y material utilizado en la Extracción de ADN a partir de plantas de zarzamora. A. Molienda de material vegetal. B. Adición de CTAB. C. Material vegetal molido. D. Material vegetal en CTAB. E. Cloroformo-alcohol isoamílico, usado para separación de fases. F. Baño maría. G. Muestras a las que se le agrego Cloroformo-alcohol isoamílico. H. Tubo con ADN genómico. I. Preparación de muestras para electroforesis	39
Figura 6. Nano Drop 2000c de BIORAD®	40
Figura 7. Proceso y material utilizado en el PCR anidado a partir de plantas de zarzamora. A. Preparación y colocación de Solución maestra a los respectivos tubos. B. Termociclador BIORAD®-ADN Engine. C. Muestras previamente etiquetadas y preparadas. D. Colocación de muestras en el termociclador, con las condiciones anteriormente mencionadas para <i>P. sparsa</i>	41
Figura 8. Arreglo de la parcela experimental donde se llevaron a cabo las aplicaciones con Fosfito de potasio (Supa Active ^R). A dosis de 3.5 L ha ⁻¹ , de acuerdo al programa de aplicaciones indicado en el (Cuadro 1). Las letras indican las repeticiones del experimento	42
Figura 9. Proceso y material utilizado en la aplicación de Fosfito de potasio a los diferentes tratamientos de plantas de zarzamora. A. Medición de la cantidad adecuada de Fosfito de potasio para la aplicación. B. Incorporación del producto en la Mochila de aspersión. C. Aplicación de Fosfito de potasio a los diferentes tratamientos	42
Figura 10. Proceso, material utilizado y electroforesis para ver la integridad del ADN. A. Incorporación del colorante en las muestras con ADN genómico total. B. Adición de las muestras respectivas en el Gel de agarosa. C. Muestras listas	

para la electroforesis. **D.** Fotodocumentador. **E.** Bandas que muestran la integridad del ADN genómico total **46**

Figura 11. MP= Marcador de peso de 1Kb. PCR anidado con los primers PR3/PR4 en dilución 1/80, siguiendo las condiciones de Aegerter y colaboradores. T= testigo negativo. P= testigo positivo (muestras secuenciada de *P. sparsa*). Carriles 1-5; Hojas asintomática (Ziracuaretiro, Mich). Carriles 6-12; Hoja sintomáticas (Ziracuaretiro, Mich). Carriles 13-19 Hojas sintomáticas (Ziracuaretiro, Mich). Carriles 20-21 Hojas jóvenes asintomáticas. Carriles 22-25 Hojas sintomáticas (Ziracuaretiro, Mich). **49**

Figura 12. MP= Marcador de peso de 1Kb. PCR anidado con los primers PR3/PR4 en dilución 1/80, siguiendo todas las condiciones de Aegerter y colaboradores. Carriles 1-3; Hojas sintomáticas (Ziracuaretiro, Mich). Carriles 4-6; Hojas asintomáticas (Ziracuaretiro, Mich). Carriles 7-9 Hojas de planta de Rosal asintomáticas, al lado de parcela comercial (Ziracuaretiro, Mich). Carril 10; Hoja asintomática de parcela comercial del Municipio de Ario de Rosales, Mich. **51**

Figura 13. MP= Marcador de peso de 1Kb. PCR anidado con los primers PR3/PR4 en dilución 1/80, siguiendo las condiciones de Aegerter y colaboradores. Carriles 1-3; Hojas asintomáticas de parcela comercial (Ario de Rosales, Mich). Carriles 4-8; Hojas sintomáticas de parcela comercial (Ario de Rosales, Mich). Carril 9; Hojas de planta asociada al cultivo (Maleza) sintomática. Carril 10; Hojas de planta de zarzamora silvestre cercana al Municipio de Ario de Rosales, Mich. Carriles 11-14; Hojas asintomáticas de parcela comercial (Ario de Rosales, Mich). Carriles 15-18; Hojas asintomáticas de parcela comercial (Tacámbaro, Mich). Carriles 19-20; Hojas sintomáticas de vivero comercial (Tacámbaro, Mich). Carriles 21-23; Hojas asintomáticas de vivero comercial (Tacámbaro, Mich) **53**

Figura 14. MP= Marcador de peso de 1Kb. PCR anidado con los primers PR3/PR4 en dilución 1/80, siguiendo las condiciones de Aegerter y colaboradores. Carril 1; Hojas asintomáticas de zarzamora silvestre (Cercano a Villa Madero, Mich). Carriles 2-3; Hojas sintomáticas de vivero comercial (Huatarillo, Los Reyes, Mich) Carril 4; Hoja asintomática de vivero comercial. Carril 5-8 sintomáticas de plantación comercial (Huatarillo, Los Reyes, Mich). Carriles 9-12; Hojas de planta asociada al cultivo (*Rubus* sp var. Brazos) asintomática. Carril 13-16; Hojas asintomáticas de plantación comercial de zarzamora, (Rancho Santino, Atapan, Mich). Carriles 17-19; Hojas sintomáticas de parcela comercial (Rancho Santino, Atapan, Mich). Carriles 20-23; Hojas asintomáticas de parcela comercial (Atapan, Mich) **54**

Figura 15. Árbol filogenético construido con el método de Máxima Parsimonia utilizando 1000 repeticiones bootstrap. Las secuencias corresponden a las amplificaciones de el espacio transcrito interno del rADN de *Peronospora sparsa*. *Botryotinia fuckeliana* fue considerada como fuera de grupo **56**

Figura 16. Efecto de programas de aplicación de Fosfito de potasio (48.6% de ácido fosforoso) a una dosis de 3.5 L ha⁻¹ sobre la Incidencia del secamiento de la zarzamora. Tratamiento 1: 3 aplicaciones iniciando el 31/07/2010. Tratamiento 2: 3 aplicaciones iniciando el 31/07/2010. Tratamiento 3: 4 aplicaciones iniciando 31/07/2010. Tratamiento 4: 7 aplicaciones iniciando el 31/07/2010. Tratamiento 5: 4 aplicaciones iniciando el 08/09/2010. Tratamiento 6: 2 aplicaciones iniciando el 08/09/2010. Tratamiento 7: 3 aplicaciones iniciando el 05/10/2010. Tratamiento 8: Testigo. Todos los tratamientos fueron aplicados en la misma dosis **57**

Figura 17. MP=Marcador de peso de 1Kb. PCR anidado con los primers PR3/PR4 en dilución 1/80, siguiendo las condiciones de Aegerter y colaboradores. T= testigo negativo. P= testigo positivo (muestras secuenciada de *P. sparsa*). Carriles 1-20 PCR de las primeras 20 muestras (Hojas asintomáticas) del experimento de la parcela comercial en el Municipio de Ziracuaretiro, Michoacán, antes de la aplicación con Fosfito de potasio **58**

Figura 18. MP=Marcador de peso de 1Kb. PCR anidado con los primers PR3/PR4 en dilución 1/80, siguiendo todas las condiciones de Aegerter y colaboradores. T= testigo negativo. P= testigo positivo (muestras secuenciada de *P. sparsa*). Carriles 21-40 PCR de las siguientes 20 muestras (Hojas asintomáticas) del experimento de la parcela comercial en el Municipio de Ziracuaretiro, Michoacán, antes de la aplicación con Fosfito de potasio **58**

Figura 19. MP=Marcador de peso de 1Kb. PCR anidado con los primers PR3/PR4 en dilución 1/80, siguiendo todas las condiciones de Aegerter y colaboradores. T= testigo negativo. P= testigo positivo (muestras secuenciada de *P. sparsa*). Carriles 1-20 PCR de hojas asintomáticas del experimento de la parcela comercial en el Municipio de Ziracuaretiro, Michoacán, en una etapa intermedia a las aplicaciones con Fosfito de potasio **59**

Figura 20. MP=Marcador de peso de 1Kb. PCR anidado con los primers PR3/PR4 en dilución 1/80, siguiendo las condiciones de Aegerter y colaboradores. T= testigo negativo. P= testigo positivo (muestras secuenciada de *P. sparsa*). Carriles 1-20 PCR de frutos sintomáticos del experimento de la parcela comercial en el Municipio de Ziracuaretiro, Michoacán, al final de las aplicaciones con Fosfito de potasio **59**

Figura 21. MP=Marcador de peso de 1Kb. PCR anidado con los primers PR3/PR4 en dilución 1/80, siguiendo todas las condiciones de Aegerter y colaboradores. T= testigo negativo. P= testigo positivo (muestras secuenciada de *P. sparsa*). Carriles 21-40 PCR de frutos sintomáticos del experimento de la parcela comercial en el Municipio de Ziracuaretiro, Michoacán, al final de las aplicaciones con Fosfito de potasio

DETECCIÓN MOLECULAR DE *Peronospora sparsa* Berk AGENTE CAUSAL DEL MILDIÚ DE LA ZARZAMORA Y EVALUACIÓN DEL FOSFITO DE POTASIO PARA SU MANEJO EN MICHOACÁN

MOLECULAR DETECTION OF *Peronospora sparsa* Berk DOWNY MILDEW AGENT OF THE BLACKBERRY AND EVALUATION OF POTASSIUM FOSFITO FOR HANDLING IN MICHOACAN

Rodríguez-Díaz, K. J., Silva-Rojas, H. V. Rebollar-Alviter, A. y Leyva-Mir S.G.

RESUMEN. Los objetivos de esta investigación fueron realizar la detección molecular del agente causal del mildiú, causada por el oomicete *Peronospora sparsa* Berk, en las principales regiones productoras de Michoacán y evaluar tiempos de aplicación del fosfito de potasio para su manejo en una parcela comercial. Se realizaron colectas del material vegetal sintomático y asintomático de zarzamora cultivada de plantaciones comerciales, viveros, silvestres y plantas asociadas en los municipios de Ziracuaretiro, Tacámbaro, Los Reyes, y Ario de Rosales, entre los meses de abril y julio de 2010. Se estandarizó una metodología de PCR anidada para permitir la detección eficiente y oportuna de *P. sparsa* en hojas y frutos. Los análisis de las secuencias del ADN ribosomal de la región ITS fueron comparados con las depositadas en el Genbank indicando que la especie de oomicete detectado coincide con *P. sparsa*. En cuanto a las aplicaciones de fosfito de potasio, los resultados no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos ($P=0.28$).

Palabras clave: *Peronospora sparsa*, fosfito de potasio, PCR.

ABSTRACT. The objective of this research was to assess the molecular detection of the causative agent of powdery mildew, caused by the oomicete *Peronospora sparsa* Berk, in the main producing regions of Michoacán. Also an evaluation of the timing application of potassium phosphite for handling in comercial plot was corred out. Sampling (April and July 2010) were obtained from symptomatic and asymptomatic plant material cultivated blackberry plantations, nurseries, wildlife and associated plants in the municipalities of Ziracuaretiro, Tacámbaro, Los Reyes, and Ario de Rosales. We standardized a nested PCR methodology to enable efficient and timely detection of *P. sparsa* in leaves and fruits. The analysis of ribosomal DNA sequences of the ITS region were compared with those deposited in GenBank indicate that the species detected of oomicete *P. Sparsa*. Concerning applications of potassium phosphite, the results showed no significance ($P=0.28$) differences among treatments.

Key words: *Peronospora sparsa*, potassium phosphite, PCR.



I. INTRODUCCIÓN

La zarzamora (*Rubus* sp.) es una frutilla que pertenece a la familia Rosaceae y al género *Rubus*, se conocen más de 350 especies distribuidas en todo el mundo. Su cultivo presenta un gran potencial, dado su significativo incremento en el consumo de sus frutos, por lo que el mercado se vuelve cada vez más atractivo.

A nivel mundial se estimó que en el 2005 existieron 20,035 ha cultivadas comercialmente con zarzamora, con una producción de 154, 603 t, lo que significó un incremento del 45% de la superficie estimada en el año 1995 (Strik *et al.*, 2006).

Europa en el 2005 tuvo la mayor superficie de zarzamora cultivada comercialmente del mundo, con aproximadamente 7,692 ha Serbia representaba el 69% (5,300 ha) de la superficie cultivada con zarzamora en Europa y se consideró como la mayor superficie en el mundo; con una producción de 27,557 t, ocupando el cuarto lugar en producción mundial.

El segundo país productor de Europa fue Hungría (21% de la superficie cultivada en Europa), con 1,598 ha y 13,227 t de producción. Seguido de Croacia con 180 ha, Alemania con 109 ha y Reino Unido, Rumania, Polonia (101 ha cada uno).

En Norte América, Estados Unidos contaba con el 67% de la superficie cultivada en el 2005 (Strik *et al.*, 2007) con poco más de 4,800 ha, siendo el segundo país productor en el mundo. Con una producción de 35,099 t. Para este mismo año el 67% de la superficie cultivada (alrededor de 3,138 ha) con zarzamora en Estados Unidos estaban sembradas en Oregón, con una producción de 25,185 t, seguido del estado de California con 283 ha y 2,600 t. Texas reportó c 680 ha y 800 t Arkansas 600 ha y alrededor de 1,543 t de producción, un aumento del 60% desde 1995. Georgia ha triplicado su superficie en los últimos 10 años a 315 ha.



México representó el 32% de la superficie cultivada en Norte América en el año 2005 con 2,300 ha. En el 2008 existían en nuestro país 8,193.95 ha sembradas con zarzamora y una superficie cosechada de 6,459.95 ha con una producción de 118, 421. 73 t (SIAP-SAGARPA, 2010), situando al país como el primer exportador mundial de zarzamora.

Las variedades predominantes de zarzamora son Tupy y Brazos. La mayor parte de la producción mexicana se destina para su consumo en fresco y para los mercados de exportación a EUA.

Para el caso particular de México, EUA es el principal mercado de exportación (promedio de consumo del 97.8 % de las exportaciones). Asimismo se realizan algunos envíos a Canadá, España, Reino Unido, Francia, Hong Kong y Argentina; los envíos a estos dos últimos, no son consistentes, se manejan ocasionalmente y con volúmenes marginales.

El cultivo de la zarzamora ha tomado impulso en México ya que es un producto apreciado por el mercado Norteamericano y Europeo por lo cual se ha incorporado como cultivo estratégico, despertando gran interés debido a su alta rentabilidad, rápida recuperación, empleo intensivo de mano de obra de aproximadamente 900 jornales por hectárea, versatilidad de los frutos para su consumo y sobre todo por su posibilidad de exportación (Calderón, 2009). La zarzamora también presenta variadas posibilidades de industrialización: entre ellas los jugos, congelados, pulpas concentradas, mermeladas, polvos deshidratados, ates y licores (Salazar *et al.*, 2002) y posee además propiedades benéficas para la salud ya que es rica en vitaminas C y E, carbohidratos, fibras, azúcares y antioxidantes (SIAP, 2010).

El cultivo de la zarzamora está basada en técnicas de producción forzada que incluyen poda y aplicación de biorreguladores del crecimiento. La fusión de los factores técnicos, sociales, económicos y climáticos permiten que la producción de zarzamora sea excelente y esto es lo que permite aprovechar la



oportunidad de mercado de este producto, principalmente en Norteamérica, Unión Europea y Japón (Calderón *et al.*, 2009).

En los últimos 10 años ha habido un crecimiento explosivo de la superficie y producción de frutillas en México. El cultivo de zarzamora creció más de 300% en este período. Dicho crecimiento obedece a la extensa red de valor que se ha desarrollado alrededor de esta y otras frutillas, y a la introducción de variedades con características deseables para el consumo en fresco e industria y a la tecnología que se ha desarrollado para la producción en temporadas que permiten la competitividad de dichas frutillas en el mercado internacional (Sánchez, 2008).

Michoacán en los últimos años se ha considerado como el principal estado productor de zarzamora en México con más del 97% de la producción en México. Cabe destacar que mientras en el 2004 el valor de las exportaciones ascendió a 38 millones de dólares, en el 2005 se alcanzaron ventas por alrededor de 81 millones de dólares (Calderón, 2009).

En el municipio de Los Reyes se encuentra la mayor superficie sembrada (4,870 ha), con una superficie cosechada de 3,500 ha y una producción de 73,056 t, el segundo municipio de importancia en cuanto a producción de zarzamora es Peribán, el cual registro una superficie sembrada de 1,828 ha y 1 600 ha cosechadas con una producción de 27,420.0 t, seguido de Tocumbo. La producción de esta frutilla genera en promedio 20 mil empleos al año, de los cuales 15 mil se encuentran concentrados en la región de los Reyes; ya que es la principal zona productora del estado (SIAP, 2010).

En nuestro país se han cultivado variedades como Cheroкке, Comanche, Cheyene, Shawnee, Choctaw y Brazos, originarias de Estados Unidos. Sin embargo, en Michoacán, más del 90% de la producción es de la variedad Tupy, originaria de Brasil. (Rebollar-Alviter *et al.*, 2009)



En los últimos años se ha presentado un problema muy grave que ha ocasionado pérdidas de hasta un 100% cuando no se realizan las prácticas adecuadas para su manejo (Rebollar-Alviter *et al.*, 2008). El agente causal reportado es el oomycete *Peronospora sparsa* Berk, también conocido con el nombre de mildiú de la zarzamora y secamiento del *berry*. En especies muy susceptibles y bajo condiciones favorables, el oomycete puede extenderse sistémicamente por toda la planta, provocando severas pérdidas como resultado de la infección en los pedicelos y los frutos, el cual ocasiona que los frutos se sequen y se partan rápidamente. Las plantas son particularmente susceptibles a la infección durante su propagación en viveros (Glubber, 1991), lo que se traduce en una disminución del rendimiento y/o una pérdida significativa de la producción. Los estudios realizados en Michoacán y en Nueva Zelanda muestran que la ausencia de síntomas en hojas no indica que las plantas estén libres de la enfermedad (Rebollar-Alviter *et al.*, 2008), por lo que se requiere desarrollar y aplicar técnicas de detección rápidas y confiables de *P. sparsa* que brinden información confiable y oportuna para la aplicación de un plan de manejo efectivo de la enfermedad en condiciones de campo. En el presente estudio se probaron las siguientes:

II. HIPÓTESIS

Es posible detectar de manera eficiente y confiable a *P. sparsa* en plantas sintomáticas y asintomáticas de zarzamora cultivada y silvestre por medio de técnicas moleculares como la PCR.

Es posible mantener la enfermedad en bajos niveles de incidencia si las aplicaciones de fosfito de potasio se realizan antes de la floración aunque el patógeno no se elimine por completo de los tejidos del hospedante.



III. JUSTIFICACIÓN

En nuestro país la zarzamora es de gran importancia económica y social ya que genera importantes ingresos, el problema del mildiú de la zarzamora apenas está siendo estudiado, se desconoce la epidemiología, ciclo de vida y técnicas de detección oportunas así como alternativas al uso de químicos para un mejor manejo de la enfermedad, por lo que resulta muy necesario continuar generando conocimiento con la finalidad de buscar las alternativas más eficientes y brindar así a los productores las herramientas para el establecimiento de programas de manejo integrado de enfermedades que contribuyan a un desarrollo sustentable.

Por esta razón el presente trabajo se realizó con la finalidad de optimizar una técnica molecular para la detección eficiente y oportuna de *Peronospora sparsa* Berk en este cultivo, así como también; evaluar otras alternativas para el control del mismo, en las principales zonas productoras del estado de Michoacán. Para lo cual se plantearon los siguientes objetivos:

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Identificar y detectar molecularmente la presencia del oomycete *Peronospora sparsa* Berk en plantas de Zarzamora y asociadas al cultivo, así como también evaluar el fosfite de potasio para su manejo.

4.2 Objetivos específicos

4.2.1 Detectar molecularmente el patógeno responsable del Mildiú y secamiento del *berry* en plantas asintomáticas y con síntomas en material de vivero, silvestre, cultivado y plantas asociadas a cultivos comerciales.

4.2.2 Evaluar los tiempos de aplicación de Fosfite de Potasio para el manejo de *Peronospora sparsa* Berk en Ziracuaretiro, Michoacán.



V. REVISIÓN DE LITERATURA

5.1 Aspectos generales del cultivo de la zarzamora en México.

5.1.1 Origen y distribución de la zarzamora en México

La zarzamora se cultivó inicialmente en regiones templadas de Asia, Europa, África, Norteamérica y las montañas de Sudamérica. Aunque el origen de la zarzamora silvestre, se cree que fue Europa y Norteamérica, ya que se han encontrado especies que datan de 350 A.C. A partir de aquí, se han domesticado tres grupos de zarzamoras. Las europeas, que se extendieron por toda Europa y gran parte de Asia, las rastreras y erectas de América del Este, y se han domesticado y empleado a nivel comercial en muy poca escala; aunque existe evidencia de su domesticación en el siglo XVII en Europa y en el siglo XIX en Norteamérica (Jennings, 1988). Los primeros colonos de Norteamérica la consideraban como una peligrosa maleza y su principal interés era el de encontrar medios para su destrucción, sin embargo, se tiene conocimiento de que la fruta fue recolectada de plantas silvestres y se utilizaba como alimento y para la elaboración de vinos (Hendrick, 1925). Este cultivo fue introducido a los Estados Unidos proveniente del viejo mundo. El clon más importante fue Loganberry introducido por Judge Logan, éste se cree es un híbrido entre la zarzamora silvestre y la frambuesa; sin embargo, no se considera como tal, sino como una mutación de la zarzamora (Jiménez, 1994).

El género *Rubus* se distribuye en todos los continentes excepto en la Antártida, con un límite norte de 65 a 75 °N (que se aproxima al Círculo Polar Ártico), incluidas las zonas de extrema aridez. En las zonas tropicales y subtropicales, el género se limita a las zonas de montaña, también se encuentra en islas oceánicas, en valles altos, en el trópico. *R. fruticosus* se considera presente en muchos otros países como especie comercial.

La zarzamora no es tan ampliamente cultivada como la frambuesa, debido a la limitada adaptabilidad de su germoplasma pero tiene puntos aceptables para su desarrollo en la fruticultura. Por ejemplo, no necesita de períodos tan prolongados de frío como la frambuesa (Pritts y Handley, 1989).



En Europa *R. lacinatus* fue la primera especie domesticada, la cual se introdujo a la región noroeste de los Estados Unidos en 1860, de donde se obtuvo una de las principales variedades de esa región, Thornless Evergreen (sin espinas siempre verde). A pesar de su utilización en diversos platillos y otros usos, a nadie le atraía practicar su cultivo de manera comercial en los Estados Unidos por las características de la planta (demasiadas espinas), hasta 1920 se inició el cultivo de forma comercial gracias al desarrollo de variedades sin espinas.

En Norte América la zarzamora era abundante como planta nativa y los colonizadores la utilizaban como alimento. En esta región las especies *R. allegheniensis*, *R. argutus*, *R. cuneifolius* y *R. canadiensis* han sido muy importantes en el desarrollo de las variedades que se cultivan en dichos países. En las zonas boscosas de México, la zarzamora crece aun silvestre (Ryugo, 1993) y la utilización de su frutilla data de tiempos remotos (Sánchez, 2008). Era llamada Coatlanti por los Azteca y Satuni por los Purépechas, ubicados en el Estado de Michoacán, donde precisamente esta planta ha tenido mayor importancia por su recolección y plantación (Jiménez, 1994). En este Estado, se reportan seis especies de zarzamora silvestre (Rzedowski, 2005).

En México, se realizaron los primeros intentos por estudiar la adaptación de cultivares de zarzamora introducidos hace más de 50 años (Pacheco, 1975). Sin embargo, comienza a llamar la atención de los productores nacionales hasta 1992 gracias a los apoyos gubernamentales para abastecer el mercado nacional y la exportación a Europa motivada por el incremento significativo de los precios de esta frutilla (Sánchez, 2008).

5.1.2. Descripción del género *Rubus* (Tourn) L

El género *Rubus* comprende alrededor de 700 especies nativas de Asia, Europa y Norte América.

Existen 12 subgéneros dentro del género *Rubus*, pero solo dos subgéneros; *Idaeobatus* y *Eubatus*, tienen importancia comercial. Teniendo que la



zarzamora se clasifica dentro del género *Rubus* subgénero *Eubatus* López (2009).

Las plantas del género *Rubus* son perennes o más frecuentemente arbustos o subarbustos, a veces bienales, erectos, rastreros o trepadores, generalmente espinosos; hojas alternas o saliendo en fascículos, pecioladas, estípulas unidas a la base del peciolo, láminas simples o lobadas o compuestas con 3 a 7 foliolos; flores generalmente perfectas, dispuestas en racimos o panículas, a veces solitarias; hipantio corto, bracteolas ausentes, generalmente con cinco sépalos y pétalos; estambres numerosos; carpelos numerosos sobre un receptáculo convexo, estilos subterminales; carpelos maduros en forma de drupillas que forman frutos agregados, dos óvulos (Rzedowski, 2001) .

5.1.3 Características botánicas de la zarzamora

Las plantas de zarzamora se caracterizan por poseer tallos espinosos, con un tallo subterráneo en forma de corona, estos tallos emiten renuevos cada año con una duración de dos años. Sus raíces crecen mucho, con tendencia a penetrar y presentar desarrollos primarios y secundarios. Las hojas son compuestas y terminan con un foliolo impar situado sobre un raquis espinoso. Las flores aparecen siempre sobre los brotes laterales del segundo año, que son mixtos con flores y un gran número de hojas. Las flores pueden ser pequeñas y grandes de color blanco o blanco verdoso y van insertadas sobre pedúnculos largos y espinosos en grupos axilares. El cáliz consta de cinco sépalos caedizos, los estambres son numerosos, separados y aparecen sobre un receptáculo convexo; cada pistilo tiene un ovario que da origen a un pequeño fruto carnoso llamado drupeola, el cual contiene una semilla poco consistente (Pacheco, 1975; Ryugo, 1993).

Las principales especies de zarzamora en el este de Norteamérica han sido cruzadas con más de uno de sus parientes Europeos. Las características que se seleccionan es su tipo de espinas, vigor, resistencia a enfermedades, sabor, tamaño de frutos, cosecha temprana, tolerancia al calor, y la productividad. En cuanto a especie, se conocen más de 350 especies distribuidas en todo el



mundo; las más comunes son: *R. allegheniensis* Porter. (zarzamora de porte arbustivo), *R. argutus* Link. (zarzamora de porte alto), *R. armeniacus* Focke. = *R. procerus* (zarzamora Himalaya), *R. fruticosus* L. (zarzamora europea), *R. glaucus* Benth. (zarzamora andina), *R. canadensis* L. (zarzamora de montaña), *R. cuneifolius* Purs (zarzamora de suelos arenosos), *R. frondosus* Bigel (de follaje muy denso), *R. hispidus* L., *R. baileyanus* Britt., y *R. trivialis* Michx. (zarzamora de hábitos rastreros) (Pritts y Handley, 1989; López, 2006).

Actualmente se comercializan variedades que se han originado de las cruzas entre varias especies que presentan características morfológicas diferentes. Por esta razón, las variedades de zarzamora se clasifican según su hábito de crecimiento en: erectas, semierectas o rastreras. Otro criterio de clasificación es por la presencia o ausencia de espinas, característica que puede ser otorgada por la hibridación entre especies (Dickerson, 2005). Es por eso que la planta de zarzamora es un híbrido producto de la crusa entre varios *Rubus* de frutos nativos de Norteamérica y Europa con *Rubus idaeus* (Muñoz y Juárez, 1995), generalmente tienen grandes espinas más que las frambuesas, pero la densidad de las espinas varía considerablemente, ya que algunos cultivares del género *Rubus* se encuentran completamente cubiertos de espinas (Pritts y Handley, 1989).

De la combinación de estas dos características morfológicas se han obtenido numerosas variedades que se clasificaron como: erect thorny (erecta espinosa), semierect thornless (semierecta sin espinas), western trailing (trepadora del Oeste), dewberries o híbridos entre zarzamoras y frambuesa (Gallardo, 1999).

5.1.4 Variedades cultivadas de zarzamora de mayor importancia en Michoacán

La SAGARPA reportó en 1994 una superficie cosechada de zarzamora en Michoacán de aproximadamente 529 ha cultivadas en su mayor parte en con la variedad Brazos. En el año 2008 se destinó un apoyo de 100 millones de pesos para la producción de 5,800 ha en los diferentes municipios de Michoacán (SAGARPA, 2008). En orden de importancia las variedades que se cultivan en



el estado son: Tupy (Figura 1), Brazos, Comanche, Cheyenne, Cherokee y Chickasaw. Un cultivar que seguramente incrementará su superficie en los próximos años en México es la variedad Kiowa. Aunque se encuentra en parcelas pequeñas bajo validación, pero con un gran potencial productivo (Rebollar-Alviter, A. 2010, comunicación personal).

Tupy. Es una variedad brasileña desarrollada por investigadores de Brasil y la Universidad de Arkansas, Estados Unidos de América, para adaptarse a zonas templadas subhúmedas, con lluvias en verano y en alturas que van de 2000 a 3000 msnm (Villalpando, 1986). La variedad Tupy tiene la mayor concentración de antocianinas, mayor consistencia y alrededor de 18 a 22 días de anaquel, tiene poca semilla y mucha pulpa. Al final, la vida de anaquel fue el principal motivo de preferencia que provocó prácticamente la sustitución de la variedad Brazos, y según Sánchez (2008) más del 90% de la superficie.

Brazos. Esta variedad fue desarrollada en Texas (EUA) y se liberó en 1959. El cultivo es de hábito semierecto, necesita espaldera para la conducción. Produce frutos firmes y grandes (6 a 7 g), sabor ácido y astringente (Raseira *et al.*, 1984; Poling, 1996). Sin embargo, la vida de anaquel es más corta que Tupy, razón por lo que está siendo desplazada por este cultivo (Rebollar-Alviter, A. 2010, comunicación personal).

Comanche. Proviene del cruzamiento entre "Darrow" y Brazos realizado en 1965. Es un cultivar de crecimiento erecto y con moderada presencia de espinas. Produce frutos muy grandes de (5 a 7 g) atractivos y firmes, de sabor ácido y astringente. Produce de 10 a 15 días después que la variedad Brazos (Moore *et al.*, 1974; Raseira *et al.*, 1984). Las plantaciones de este cultivo se mantuvieron por varios años en Zirahuén, Michoacán. Sin embargo, por problemas de heladas y enfermedades como el mildiú *P. sparsa*, la variedad comanche dejó de producirse (Rebollar-Alviter, A. 2010, comunicación personal).

Cheyenne. Fue creada en Arkansas y liberada en 1974. Muestra su hábito de crecimiento erecto al segundo año de establecida. La floración normal es de 30 días. Después de Comanche, es de fácil cosecha, tiene una duración de 50 días de flor a fruto, el cual tiene un peso promedio de 6.2 g, es firme y de mejor sabor que el fruto de la variedad Comanche (Moore *et. al.*, 1977).

Cherokee. Es una variedad vigorosa, de hábito erecto y muy productivo. La floración es de 15 días y su periodo de flor a fruto es de aproximadamente 50 días. Los frutos son firmes, de baja acidez (0.22%), muy dulce y brillante (Cano y Rodríguez, 1989).

Chickasaw. Fue creada en 1999 por la Universidad de Arkansas. Se trata de una variedad erecta espinosa. Produce uno de los más altos rendimientos de cualquier cultivo en Arkansas, es muy resistente a las enfermedades, tiene un alto rendimiento superando a todos los demás cultivares de investigación en algunas plantaciones. Sus frutos maduran a partir de junio y se extiende hasta cinco o seis semanas, con un promedio de 10 a 11 g. por fruto (Peter y Timothy, 2001).

Kiowa. Es muy espinosa, las plantas crecen de 1.50 a 1.80 m de alto y se extienden entre 1.20 a 2.40 de ancho. La floración dura más tiempo que las otras variedades de zarzamora da grandes cantidades de frutos durante varias semanas con un promedio de 12 g por fruto (William, 2006).



Figura 1. Plantas de zarzamora *Rubus* sp. var. Tupy

5.1.5 Especies silvestres de zarzamora en México

El subgénero *Eubatus* es heterogéneo y abarca más de 350 especies, la mayoría de ellas son silvestres, autocompatibles y con alto potencial de hibridación. Su reproducción es sexual y por apomixis (reproducción por semillas que se desarrollan sin fusión sexual). Las semillas son la causa principal de la variación sexual pero que ocurre sin que haya fertilización y/o meiosis (Jiménez, 1994). La dispersión de semillas y la rápida propagación vegetativa han permitido una gran especiación dentro del subgénero. En forma natural ocurre poliploidia (intervalo de diploide $2x=wn=14$ a dodecaploide $12x=2n=84$) (Pritts y Handley, 1989) presenta en el material silvestre (Pacheco, 1975). En México, específicamente en la Meseta Puhrépecha de Michoacán, se han identificado las especies siguientes: *Rubus adenotrichus* Schltld., (Figura 2) *R. coriifolius* Liebm., *R. humistratus* Steud., *R. sapidus* Schltld., y *R. tricomallus* Schltld (López, 2009).



Figura 2. Planta de zarzamora silvestre *Rubus adenotrichus* Schltld.



5.1.6 Requerimientos climáticos para el cultivo de zarzamora

El cultivo de zarzamora crece muy bien en los climas templados o semicálidos con inviernos benignos (Venegas, 2001). Se adapta a un intervalo climático variado y destaca su adaptación a las zonas llamadas de “transición” (Chávez, 1999). La zarzamora presenta una gran adaptabilidad a diferentes condiciones de suelos y climas, que van desde el ártico hasta los trópicos (Ryugo, 1993). Aunque se menciona que los frutales espinosos se desarrollan mejor en condiciones frescas (Schneider, 1979). En el caso de las zonas productoras de Michoacán, tienen una temperatura promedio que va de 32°C (máxima) a 8°C (mínima), con los valores más altos durante los meses de marzo a junio, y los más bajos de diciembre a febrero. La acumulación de frío durante el invierno es de 50 a 250 horas. La precipitación pluvial anual oscila entre 800 y 1,200 mm, iniciando la temporada de lluvias a finales de mayo y terminando a mediados de octubre (López, 2006).

5.1.7 Propagación de la zarzamora

El material para el establecimiento de huertos comerciales de zarzamora, se obtiene utilizando estacas de raíz o tallos, acodo de puntas y estacas de hojas con yemas. El método más común de propagación de la zarzamora bajo condiciones de invernadero es mediante fracciones de raíces sembradas en bolsas de polietileno negro (Moore y Skirvin, 1990).

5.2. Ciclo de crecimiento de la zarzamora

a) Desarrollo de primocañas. Las primocañas se originan de yemas adventicias de la raíz en las zarzamoras erectas y semierectas, y de la corona en las zarzamoras rastreras. Ello puede ocurrir en cualquier época del año si las condiciones de crecimiento son apropiadas.

Por su hábito de crecimiento las cañas se clasifican en:

1) Erectas, 2) Semierectas y 3) Rastreras.

Según su epidermis, las cañas pueden ser:

1) Con espinas y 2) Sin espinas



b) Diferenciación floral. Después de 4 a 6 meses de crecimiento activo de las primocañas, las yemas vegetativas inician su transición hacia yemas florales. En lugares de clima templado, este evento ocurre entre finales del verano y principios del otoño (Septiembre-Octubre). En lugares de clima semicálido, este evento puede ocurrir en cualquier tiempo del año, siempre y cuando haya condiciones favorables para el crecimiento de las cañas. Para hacer la práctica de producción forzada, es necesario que el proceso de diferenciación haya iniciado; de lo contrario, los brotes que se obtengan serán vegetativos.

c) Apertura de yemas y floración. Normalmente, las zarzamoras requieren pasar por un período de reposo y completar ciertos requerimientos de frío (temperaturas menores a 7.2°C) a fin de que las yemas completen el proceso de diferenciación floral y sean capaces de abrir. Sin embargo, bajo el esquema de producción forzada, las prácticas de defoliación y aplicación de sustancias estimuladoras del crecimiento compensan el periodo de dormancia, pudiendo ocurrir la aparición de botones florales en cualquier tiempo. La floración ocurre por lo general de 4 a 6 semanas después del rompimiento de yemas. Es importante señalar que bajo condiciones subtropicales, aun cuando las prácticas de producción forzada se hacen de manera correcta, es común que algunas yemas en las floricañas no lleguen a abrir; esta es una respuesta natural de la planta por la falta para completar sus requerimientos de horas frío.

d. Desarrollo y maduración de frutos. Dependiendo de la variedad, frutos requieren de 40 a 60 días para desarrollarse y madurar. La zarzamora presenta un fruto agregado (polidrupa), que posee como característica básica, la presencia de drupeolas glabras que se adhieren al receptáculo y este permanece adherido en las plantas de zarzamoras cuando éstas son cosechadas. Los frutos se desarrollan a partir de una flor solitaria de 5 pétalos, a través de la adhesión de muchos carpelos separados (drupeolas) los cuales se agregan en masa, de color negro brillante cuando maduran (Moore y Skirvin, 1990; Ryugo, 1993; López, 2009).



e) Senescencia de floricañas. En las regiones de clima templado, las cañas mueren pocos días después de la fructificación; mientras que en las regiones subtropicales, después de haber fructificado una misma caña puede ser forzada a producir una segunda floración y cosecha aprovechando aquellas yemas que quedaron sin brotar en la primera forzada (López, 2009).

5.2.1 Cultivo de la zarzamora

La distancia de plantación en campo puede ser de 1.80 a 2.40 m entre hileras y de 50 y 70 cm entre plantas, resultando una densidad de 6, 000-11,100 plantas por ha. Cuando se hace el trasplante para establecer huertos nuevos, se usan plantas provenientes de viveros en los que las nuevas plantas se obtienen de fracciones de raíces sembradas en pequeñas bolsas de polietileno negro.

Para el sistema de conducción y soporte para las plantas de zarzamora; el método más usado es un sistema vertical compuesto de varios alambres, uno sobre otro de aproximadamente 1.7 a 1.8 m de altura; se usan desde 3 hasta 5 alambres en cada línea separados a distancias iguales entre ellos, el primer alambre casi siempre se coloca a 40-50 cm del suelo. Los alambres son sostenidos por postes metálicos cada 7 metros principalmente. También se puede encontrar de concreto y de madera; como la planta es muy vigorosa, las cañas prácticamente se deben enrollarse sobre el sistema de soporte (Calderón, 2007).

5.3. Problemática del cultivo.

Existe un significativo incremento en el consumo per cápita de frutos de zarzamora y frambuesa en México, por lo que el mercado nacional se vuelve cada vez más atractivo. Se reporta que en 2002 el consumo per cápita era de apenas unos 50 g pero cuatro años después (2006) ya era de 250 g por persona. Se estima un consumo conjunto nacional de zarzamora y frambuesas de entre 20 y 25 000 (SAGARPA, 2006).

La producción en México se basa en técnicas de producción forzada que incluye poda y aplicación de biorreguladores del crecimiento. La producción es



posible todo el año pero se exporta en meses de otoño, invierno y primavera (de octubre a mayo) que es cuando los precios en esos mercados son más atractivos por la ausencia de producción local de los importadores (Calderón, 2009).

Los problemas van desde la desorganización de productores, plagas y enfermedades, desconocimiento de la tecnología de manejo más adecuada (en especial en cuanto a defoliación y promoción de la brotación), carencia de una técnica o metodología de defoliación menos costosa y contaminante que la empleada en la actualidad, falta de nuevas variedades alternativas bien evaluadas, entre otras. La falta de un programa de asistencia técnica efectivo y con personal altamente capacitado dificulta la adopción de nuevas y adecuadas técnicas de cultivo (Calderón, 2009).

Si bien, varias compañías productoras y comercializadoras tienen su propio programa de mejoramiento o han adquirido la exclusividad de prueba y uso de nuevas variedades de frutillas de programas de mejoramiento del extranjero, es lamentable la falta de un programa nacional de mejoramiento de frutillas. Esto es especialmente importante por el predominio notable de una sola variedad de zarzamora (Tupy) en varios miles de hectáreas de cultivo, lo cual, ante el desarrollo de un problema fitosanitario al que esta variedad muestre susceptibilidad, puede poner en riesgo la industria del cultivo de la zarzamora en México.

Aunque al momento no muestra ser realmente un problema, el crecimiento sin control de la superficie cultivada, si se observa con preocupación y se han iniciado acciones tendientes a mejorar la organización de los productores para asegurar un sano crecimiento de la industria zarzamora en la región. Sin embargo, este aumento descontrolado de la superficie cultivada sin estandarización de las prácticas agrícolas, puede constituir un riesgo de dispersión de plagas y enfermedades en estas zonas productoras.



Un ejemplo de este riesgo lo representan las plagas y enfermedades. En relación a este componente de la producción de berries pocas investigaciones se han realizado en México. Aunque el productor ha aprendido a reconocer los problemas de mayor importancia, poco se conoce de su identidad, biología, ciclos de vida, dinámicas, epidemiología y manejo. La inversión en investigación básica y aplicada con fondos públicos ha sido relativamente baja y aunque las compañías privadas pueden contar con sus programas de investigación, dicho conocimiento no está disponible para los productores y el público en general pues representa una ventaja competitiva para estas en relación con otras empresas del ramo o en su caso, dicha investigación se realiza exclusivamente con fines comerciales dejando al productor sin la oportunidad de contar con información imparcial que contribuya a incrementar su conocimiento del cultivo. Ante esta situación es de suma importancia la inversión pública en investigación básica y aplicada que genere conocimiento y dé soporte a la industria de las frutillas en México (Rebollar y Pineda, 2009).

En frutos de zarzamora las enfermedades de mayor importancia es la pudrición causada por *Botrytis cinerea* y el oomycete *P. sparsa*, agente causal de mildiú de la zarzamora. Este último patógeno ha ocasionado pérdidas hasta de un 100% cuando no se realizan las prácticas adecuadas para su manejo (Rebollar-Alviter *et al.*, 2008).

5.4. Aspectos fitosanitarios del cultivo de zarzamora

5.4.1 Plagas de mayor importancia

Entre los factores bióticos más importantes que causan reducciones en la producción de zarzamora en las regiones productoras de México, se encuentran las plagas y enfermedades.

Existen diversas especies de insectos plaga que causan daños importantes al cultivo de zarzamora. En EUA se han reportado diversas especies de artrópodos que ocasionan diferentes tipos de daños, los cuales perjudican tanto



la producción como la calidad del fruto. Entre las plagas más importantes se reportan al barrenador de la corona, *Pennisetia marginata* (Harris); escarabajo japonés, *Popillia japonica* (Newman); los tortricidos enrolladores de hojas, *Argyrotaenia citrana* (Fernald) y *Choristoneura rosaceana* (Harris); la araña roja, *Tetranychus urticae* (Koch) y un complejo de chinches (Ellis *et al.*, 1991).

Los enrolladores de hojas son plagas importantes debido a que provocan contaminantes en los frutos. Estas plagas invernan en las plantas silvestres en diferentes estadios larvarios y generalmente se encuentran cubiertas con las hojas caídas. Los daños son causados en los botones florales y en las hojas más tiernas donde los primeros estadios tienen el hábito de enrollarse. Estos insectos representan uno de los principales problemas entomológicos de la zarzamora y frambuesa en varias partes del mundo (Kinght y Croft, 1986).

El barrenador de la corona, *Pennisetia marginata* Harris está ampliamente distribuido en Norte América, desde Canadá hasta el Pacífico norte, Florida y el Sureste de los EUA. La larva tiene hábitos barrenadores y su ciclo de vida dura 2 años. En el primer año, las larvas realizan galerías en los tallos de zarzamora y en el segundo la planta puede estar completamente dañada (Ellis *et al.*, 1991). Esta plaga aun no se ha reportado en México, pero es muy probable que una especie similar esté asociada al barrenador de cañas de la zarzamora, plaga que cada vez toma más importancia en la variedad Tupy y Brazos en las zonas productoras de México. Estudios para la identificación de la especie y el conocimiento de su ciclo de vida están en proceso (Rebollar-Alviter, A. 2010, comunicación personal).

Macrodactylus spp., conocido como "frailecillo", el "ácaro de dos manchas" *T. urticae*, la gallina ciega *Phyllophaga* spp. son las especies más importantes en algunas regiones de México (Muratalla *et al.*, 1993).

El trips *Frankliniella occidentalis* (Pergrande) es otra plaga importante en el cultivo de zarzamora. Este insecto es de tamaño diminuto y se encuentra en la flor, alimentándose de las partes internas y causando que la frutilla no tenga un



desarrollo normal al raspar las drupelas y provocar la deshidratación de las mismas (García, 1997). La araña roja, *T. urticae* o araña de dos puntos, es la plaga más importante en el ciclo de producción que va desde enero a junio, cuando la temperatura es más alta y la humedad relativa más baja y cuando las condiciones de estrés de la planta aumentan. Las colonias de este ácaro normalmente se encuentran en el envés de las hojas, provocando amarillamiento de las mismas con una consistencia acartonada. En México es una de las plagas más severas en zarzamora y frambuesa durante los meses de febrero a mayo (Rebollar-Alviter, 2001). El ácaro *Acalitus essigi* (Hassan) se ha observado que afecta en la maduración de los frutos rojos de zarzamora en E.U.A. y otras partes del mundo. Este ácaro impide la maduración completa de las bayas, permaneciendo de un color rojo brillante y negro (Jamie *et al.*, 2001). Síntomas similares ocasionados a este ácaro han sido observados en Jalisco y Michoacán, pero no se ha confirmado la presencia de la especie (Rebollar-Alviter, A. 2010, comunicación personal). También se han encontrado a los pulgones del género *Aphis sp.*, éstos son insectos que atacan las hojas tiernas de la mora, chupan la savia y son transmisores de enfermedades causadas por virus (Cexporta, 2004).

5.4.2 Principales Enfermedades

En México se han observado enfermedades tales como la cenicilla, *Sphaerotheca macularis* Wall Fries (= *Podosphaera aphanis* Wallr), en los cultivares Cherokee y Comanche; agalla de la corona, *Agrobacterium tumefaciens* y pudriciones radicales causadas por distintas especies de hongos de los géneros *Phytophthora*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Verticillium* y *Fusarium sp.* (Muratalla, 1994). Asimismo, *Colletorichum gloeosporioides*, agente causal del tizón de brotes y antracnosis de las plantas de zarzamora, ocasiona muerte de brotes (Rebollar-Alviter *et al.*, 2008). Estas enfermedades básicamente inciden sobre las hojas o tallos de las plantas de zarzamora y el factor que favorece su presencia es la alta humedad relativa y presencia de lluvias, por lo que se presentan con frecuencia en terrenos con mal drenaje o en



plantaciones establecidas en terrenos donde se favorecen periodos de alta humedad.

Cuando la infección es severa pueden existir pérdidas considerables de materiales recién trasplantados en campo. Por otro lado, en frutos las enfermedades de mayor importancia es la pudrición causada por *Botrytis cinerea* y el oomycete *P. sparsa*, agente causal de mildiú de la zarzamora. Este último patógeno ha ocasionado pérdidas hasta de un 100% cuando no se realizan las prácticas adecuadas para su manejo (Rebollar-Alviter *et al.*, 2008). Existe un desorden causado por factores desconocidos, que se caracteriza por provocar la caída de botones florales en etapa muy temprana de su desarrollo que ocasiona pérdidas de entre 40-70% de producción. Aunque no se conocen las causas de tal desorden, comúnmente se le llama necrosamiento de yemas florales, el cual está siendo estudiado de manera intensiva con la finalidad de conocer los factores nutricionales, fisiológicos y patológicos involucrados en este desorden (Rebollar- Alviter, A. 2010, comunicación personal).

5.4.3 Virus

Entre las especies cultivadas y silvestres del género *Rubus*, se han reportado 33 enfermedades causadas por virus, 15 de estas se han encontrado en Norteamérica. Poco se conoce acerca de daños por virus en zarzamora en nuestro país; sin embargo, algunas sintomatologías observadas en el estado de México y Michoacán sugieren la presencia de enfermedades virosas, sin que aún se hayan reportado epidemias que pongan en riesgo la producción. En Michoacán los estudios para la detección de virus en zarzamora están en proceso.

Mientras tanto, Arkansas una de las fuentes más importantes de cultivares para México incluyendo materiales de Brasil y otros países de Sudamérica, cualquier importación de material debe ser cuidadosamente revisado para no poner en riesgo a la industria Mexicana, mientras se genera información propia de nuestro país (Rebollar y Pineda, 2009).



Los virus que se han encontrado afectando a la zarzamora, provocando diversas alteraciones a la planta en otros países son los siguientes: Complejo del mosaico de la frambuesa, chino de la hoja de la frambuesa, mosaico del pepino, clorosis de la nervadura de la frambuesa, nepovirus europeo, mancha anular del tomate, enanismo de la frambuesa, zarzamora cálico, virus mosaico de la manzana y enrollamiento de la hoja de la cereza (Ellis *et al.*, 1991).

Por otro lado, *Rubus* sp. es un anfitrión de menor importancia de los patógenos de cuarentena siguientes: *Anthonomus signatus*, Apple mosaico ilarvirus, el virus del mosaico del Arabis, Virus negro de la frambuesa, virus del enrollamiento de la hoja de cerezo, *Melacosoma americanum*, *Naupactus leucoloma*, *Quadraspidiotus perniciosus*, Virus latente de la mancha anular de la fresa, *Thrips imaginis*, el virus del anillo negro del tomate, virus de la mancha anular del tomate, y un hospedante para: virus de la mancha anular del tabaco, *Anthonomus bisignifer*, *Cacoecimorpha pronubana*, y el virus de la mancha anillada de la frambuesa EPPO (2009).

5.4.4 Bacterias

Agrobacterium tumefaciens es una bacteria que permanece en el suelo cuando se quitan las cañas dañadas y puede persistir en el campo durante al menos un año, o un tiempo mucho más largo si grandes cantidades de residuos de raíces infectados permanecen en el suelo (Ogawa, 2000). En campo aparecen agallas o tumores en la base de las cañas y en las raíces, inicialmente son de color cremoso y de consistencia blanda y esponjosa y posteriormente oscura de consistencia leñosa y deforme. En la base de las cañas se observan grandes masas de tejido deforme al nivel del suelo de más de 15 cm de diámetro. En consecuencia, las plantas pueden exhibir un pobre crecimiento, se rajan e incluso pueden secarse, los frutos son poco desarrollados y no tienen calidad. Generalmente, los tumores están asociados con heridas en los tallos provocadas por agentes naturales o biológicos. En observaciones de campo se ha visto que la enfermedad se asocia con la presencia del barrenador de la



corona. Las larvas de este insecto perforan la base de la caña y corona. La enfermedad es más severa en cañas en producción (Rebollar y Pineda, 2009).

La bacteria sobrevive en el suelo e infecta la base de las cañas y raíces a través de aberturas naturales y heridas ocasionadas por insectos, podas, labores culturales, rupturas o daños por heladas y aberturas naturales. El viento y la lluvia juegan un papel importante en la diseminación de la bacteria, especialmente durante el verano, cuando se presentan los daños mayores. Sobre la superficie de los tumores se concentra la mayor cantidad de bacterias, las cuales se desprenden de tumores secos y desintegrados por acción de la lluvia o el viento. Una vez que la bacteria infecta, en 3 a 4 semanas se observan los primeros síntomas, dependiendo de las condiciones ambientales. La enfermedad se favorece con temperaturas entre los 15 y 22°C (Agrios, 2005). Para su control se recomienda realizar aplicaciones quincenales de *Agrobacterium radiobacter* dirigidas a los brotes en crecimiento y al momento de la apertura floral (Ogawa, 2000). Para el manejo de los cánceres ocasionados por bacterias en frutillas se recomienda destruir las plantas con agallas o tumores y hacer aplicaciones con caldo bordelés cuando inicien las lluvias y repetir el tratamiento 4 semanas después en las plantas cercanas al punto de infección. También se menciona que aplicaciones con cobre pueden ser efectivas (Antonelli *et al.*, 2008). Se debe tomar en cuenta lo observado en las parcelas de Michoacán en cuanto a que la bacteria aprovecha las heridas en la planta y que el barrenador de la corona puede estar asociado con esta enfermedad, así que sería recomendable también buscar las coronas dañadas por el barrenador y destruirlas y realizar un tratamiento en las plantas cercanas al punto de infección (Rebollar y Pineda, 2009).



5.4.5 Malezas

Las malezas también juegan un rol importante, ya que influyen en la producción de zarzamora son; estas no sólo compiten con el cultivo por el agua, luz y nutrientes, sino que también pueden ser hospederas de plagas y condicionan el ambiente para el desarrollo de enfermedades, además de que interfieren con las operaciones de cosecha y afectan la estética de la plantación (Berlijn, 1990). Las malezas perennes y los pastos establecidos deben ser eliminados antes de la plantación (Poiling, 1996). El control mecánico o físico consiste en eliminar las malezas a mano con herramientas como el azadón, machete o guadaña, a escala mayor se emplean máquinas tales como segadoras, cultivadoras o rastras de disco (Berlijn, 1990).

5.5. El mildiú o secamiento del Berry de la zarzamora

Esta enfermedad es causada por el oomycete *Peronospora sparsa*

Sinónimos: *Pseudoperonospora sparsa* (Berk). Jacz.

Peronoplasmopara sparsa (Berk.) Uljan.

Peronospora fragariae Roze & Cornu

Peronospora rosae-gallica Savul. & Rayss

Peronospora rubi Rabenh. ex J. Schröt.

Nombre de la enfermedad: Downy mildew

Nombre común de la enfermedad: Mildiú del rosal; Mildiú veloso, esponjoso o suave, secamiento del *Berry* de la zarzamora.

Peronospora sparsa fue encontrado por primeramente vez en 1862 por Berkeley causando pérdidas en un invernadero en Inglaterra Baker (1953). Fue reportado también en Italia en 1875. Pero el primer reporte definitivo es el de Wittmack, quien encontró la enfermedad cerca de Berlín en 1876 y en los años siguientes fue afectando a las rosas en invernadero. Desde entonces la enfermedad se ha encontrado en la mayoría de los países de Europa; Austria y Francia en 1880; en Dinamarca en 1884, donde destruyó a 2,000 rosales; en Silesia en 1891, mató a 400,000 rosales; en el Cáucaso Ruso en 1897 y en



Holanda en 1901 y 1902; Suecia en 1905; en Egipto en 1924; en Polonia en 1926 y en Dinamarca de nuevo en 1927 y posteriormente se detectó en Rumania en 1932. También se observó en la Columbia Británica y Canadá en 1937, en Brasil en 1939, e Islandia en 1950. El agente causal fue identificado como *Peronospora rosae gallicae* Say. & Rayss, aunque su nombre actual es *Peronospora sparsa* Berk.

Por otro lado, en los Estados Unidos la enfermedad fue registrada primeramente en 1880 cerca de San Rafael, California en *Rosa californica*. En New Jersey fue reportada por Halsted en 1893, pero hay dudas si ocurrió la enfermedad en ese lugar, aunque fue definitivamente reportada en 1912 como *P. sparsa* (Baker, 1953).

5.6. Origen del Patógeno

No se sabe dónde se originó *P. sparsa*, aunque las especies de *Rubus* y *Rosa* son nativas del hemisferio norte. El comercio extensivo de material de rosa para propagación se produjo durante la segunda mitad del siglo XIX, ofreciendo una vía probable para la distribución del patógeno. Casi al mismo tiempo, Europa y los fitopatólogos estadounidenses comenzaron a publicar informes de los hongos patógenos de plantas. Por lo tanto, puede ser que los primeros informes publicados solo son un reflejo del lugar geográfico de las actividades de estos especialistas más que de la distribución real del patógeno. A medida que la enfermedad parecía haber sido bastante generalizada a finales del siglo XIX, es muy difícil determinar dónde se originó el patógeno.

Sin embargo, la enfermedad se observó por primera vez y el patógeno fue descrito en Inglaterra, Reino Unido en 1862 por Berkeley (Berkeley, 1862). Posteriormente nuevos reportes aparecieron en Países de Europa occidental, en la República de Georgia, y en los EUA a finales de 1800, y después en otros continentes, desde Egipto en 1924-1925 (Fahmy, 1927), Brasil en 1939 (Pickel, 1939), Japón en 1952, Nueva Zelanda en 1961 (Smith y Newhook, 1961) y Australia en 1971 (Johns, 1972). Algunos de los más recientes informes de



primera "incluyen a China en 1996 (Tian *et al.*, 1998) y la India en 1998 (Ramachandran *et al.*, 2003).

Los registros de la enfermedad en el mundo son del Norte del Trópico de Cáncer, excepto el de Sao Paulo, Brasil que se encuentra en una meseta justo al norte del Trópico de Capricornio (Baker, 1953).

En las rosas silvestres o híbridas antes de 1850 no se controlaba el oomycete, con el aumento del cultivo de rosas a partir de este año, hubo un intercambio de material vegetal y pudo ser probable que se distribuyera por material vegetal y semillas infectadas.

5.6.1 Importancia, distribución y hospedantes

Si bien la frecuencia de este oomycete es alta, y esta reportado en más de 120 artículos. La literatura y los fitopatólogos han subestimado la importancia potencial de esta enfermedad y sus consecuencias (Baker, 1953).

El patógeno provoca la enfermedad más peligrosa del rosal, ya que ocasiona una rápida defoliación, y si no se actúa a tiempo puede resultar muy difícil recuperar la planta (Mendoza-Zamora, 1993).

Peronospora sparsa, agente causal de mildiú de la zarzamora, ha ocasionado pérdidas hasta de un 100% cuando no se realizan las prácticas adecuadas para su manejo (Rebollar-Alviter, 2008).

La enfermedad se ha reportado en Brasil y su distribución se ha ampliado en los últimos años recientes a países como Israel, Egipto y Australia (Dismok y Tammen, 1987). El mildiú está ampliamente distribuido en Colombia, Estados Unidos de Norteamérica, y En Nueva Zelanda, Polonia y Reino Unido (Horst, 1983)

Este patógeno, que anteriormente estaba limitado a países que se encuentran al norte del Trópico de Cáncer, se ha distribuido en muchas partes del continente americano (Mendoza-Zamora, 1993).



En Estados Unidos fue reportado por Horkness y Moore cerca de San Rafael, California; posteriormente Plunket (1928) la observó en varios invernaderos en la costa sur de California y desde entonces se ha observado en los estados de Idaho, Iowa, New Jersey, New York, Manie, Ohio, Florida, Texas y Pennsylvania.

En México se ha encontrado causando daños muy severos en Invernaderos en Texcoco, México, Ixtapan de la Sal, México y Uruapan, Michoacán; aunque no se descarta que exista en otros sitios (Mendoza-Zamora, 1993), y en zarzamora fue reportado por primera vez en México por Rebollar-Alviter *et al.* (2009).

Hay cerca de 120 especies de rosas silvestres y más de 20,000 variedades comerciales. Sin embargo las siguientes especies han sido señaladas como hospedantes: *Rosa x noisetteana*, *Rubus villosus*, *R. corcorifolius*, *Rubus tuberculatus*, *Rubus sulcatus*, *Rubus plicatus*, *Rubus leucodermis*, *Rubus flagellaris*, *Rubus corylifolius*, *Rubus cissoides*, *Rubus canescens*, *Rubus armeniacus*, *Rubus arcticus* subsp. *arcticus*, *Rubus arcticus notho* subsp. *stellarcticus*, *Rubus x "Boysenberry"*, *Rubus x "Ollalieberry"*, *Rubus x "tayberry"*, *Rubus "Tummelberry"*, *Rubus "Youngberry"* y *Rubus fruticosus*. No se han publicado informes de especies resistentes. La mayoría de los cultivares comerciales son susceptibles a mildiú, aunque puede variar en la magnitud de su susceptibilidad (CABI, 2011).

5.6.2 Descripción morfológica del agente causal

El agente causal del mildiú de la zarzamora es el oomycete *Peronospora sparsa* Berk. el cual fue reportado por primera vez en el cultivo de zarzamora (*Rubus* sp.) en México por Rebollar-Alviter *et al.* (2009). Este patógeno es un parásito obligado. La hifa intercelular es cenocítica y hialina. El oomycete produce haustorios filamentosos en el tejido mesófilo de las hojas y en las capas exteriores del parénquima de hojas y cañas. Los esporangióforos de *P. sparsa* miden 490-600 X 4-6 µm de ancho y 300- 465 µm de longitud. Presentan ramificación dicotómica 3 a 4 veces y se extienden 12-16 µm de longitud, son delgados y estrechos. Cada par de ramificaciones se curvan. Los esporangios (18-24 X 16-



20 μm) son ovoides a elipsoides y de color amarillo pálido; puede estar presente ocasionalmente un pedicelo corto en esporangios separados. Las oosporas miden de 22-30 μm de diámetro y tienen una pared hialina; no existen reportes de su presencia en campo de ejemplares en Europa, pero han sido observados cuando se inoculan hojas *invitro* (Gluber, 1991).

5.6.3 Signos y Síntomas

El síntoma que ocasiona *P. sparsa* aparece primero en las hojas como una decoloración amarillenta en la superficie de estas, las cuales pronto cambian su coloración a rojo-púrpura. Las lesiones son usualmente angulares y limitadas por las nervaduras. En algunos cultivares, el síntoma en las hojas es muy característico por las manchas de coloración púrpura, las cuales generalmente se extienden a lo largo de las venas laterales (Figura 3A). En la superficie de las hojas bajas se observa que aparecen directamente áreas de color rosa debajo de las manchas, estos son los signos del oomycete, formando masas de esporas que se producirán solamente en la superficie de las hojas bajas e irán tornándose inicialmente blanquecinas pero con la luz comenzaran a ponerse grises hasta secarse con la edad.

Los síntomas en infecciones sistémicas provocan daños más severos como la distorsión de los tejidos con coloraciones rojizas. Las hojas infectadas con el paso del tiempo, muestran las manchas con los márgenes de un color amarillo brillante y el centro café. Los chupones que se originan de las plantas infectadas también muestran los mismos síntomas. Las cañas y frutos infectados también desarrollan manchas irregulares rojizas en la epidermis. En infecciones severas las hojas frecuentemente caen prematuramente, los frutos pierden su brillo y lucen opacos. En infecciones tempranas los frutos verdes son inducidos a su maduración prematura, estos entonces se marchitan y se secan rápidamente (Figura 3B). Si llevan infectados un gran período de tiempo frecuentemente se parten en dos y ambas partes comienzan a arrugarse y/o marchitarse. Los estudios realizados en Michoacán y en Nueva Zelanda muestran que la

ausencia de síntomas en hojas no indica que las plantas estén libres de la enfermedad (Rebollar-Alviter *et al.*, 2008).

En las hojas infectadas de las primocañas el oomycete comenzara a esporular, pero las hojas de frutos laterales infectados pueden ser fuente de inóculo para nuevas infecciones. Las infecciones sistémicas en hojas requieren de condiciones de humedad cuando las hojas se están desarrollando. Se puede observar la esporulación en follaje muy denso cerca de las cañas, donde la humedad es intensa. Las malezas con abundante follaje favorecen el desarrollo de la enfermedad en los brotes nuevos o en los frutos laterales (Gluber, 1991).

Por otro lado estudios recientes realizados por Rebollar y colaboradores confirman la presencia de esta enfermedad en las zonas productoras de zarzamora en el estado de Michoacán (Rebollar-Alviter *et al.*, 2009). La enfermedad puede encontrarse en hojas, pecíolos, pedicelos, cáliz, frutos y en las primocañas de zarzamora. En especies muy susceptibles y bajo condiciones favorables, el hongo puede extenderse sistémicamente por toda la planta, provocando severas pérdidas como resultado de la infección en los pedicelos y los frutos, el cual ocasiona que los frutos se sequen y se partan rápidamente. Las plantas son particularmente susceptibles a la infección durante su propagación en viveros (Gluber, 1991).



Figura 3. Síntomas de *P. sparsa*. **A.** Distorsión de los tejidos con coloraciones rojizas en hojas. **B.** Manchas irregulares rojizas en la epidermis, pérdida de brillo, maduración prematura, partición de los frutos de *Rubus* sp.



5.6.4 Ciclo de vida y epidemiología

El Oomycete inverna primariamente como infección sistémica en caña, corona, raíces y yemas. El ciclo se inicia cada primavera con la producción de estas partes infectadas. Las hojas que se desdoblán son invadidas durante las condiciones templadas y húmedas. Las infecciones secundarias en flores y frutos en desarrollo se presentan a partir de la floración y sigue hasta la cosecha, principalmente por las oosporas que se producen en yemas muertas. Después de la cosecha, la infección de las cañas que se encuentran al nivel del suelo, continúa por el crecimiento del micelio y la infección por oosporas. Los esporangios se producen durante la noche y son diseminados por el viento hacia las hojas, botones florales y frutos en desarrollo para continuar el ciclo infectivo. La formación de oosporas se presenta entre 5 y 11 días después de la infección a una temperatura de 18°C (Gubler, 1991).

En un estudio realizado por Xu y Pettitt (2004), donde extrajeron y aumentaron la cantidad de oosporas, estas demostraron ser viables, el 20% de oosporas dieron lugar a infecciones en inoculaciones artificiales de rosa.

La propagación en plantas sistémicamente infectadas, resulta en una incidencia del 100% en plantaciones nuevas (Smith y Fox, 1991). La importancia de las oosporas dentro del ciclo, aun no se conoce, pero su presencia en hojas, provee una fuente de inóculo en viveros. Los síntomas se desarrollan de 10 a 11 días después de la infección, la formación de oosporas se presenta entre 5 y 11 días a una temperatura de 18°C (Gubler, 1991).

La infección requiere agua libre sobre la superficie de la planta y las temperaturas en el rango de 2 a 26°C (Breese *et al.*, 1994). La temperatura óptima para la infección es generalmente alrededor de 15 ° C, aunque esto parece variar un poco con el aislamiento (Aegerter *et al.*, 2003; Breese *et al.*, 1994.). La duración de la humedad requerida depende de la temperatura. En temperaturas óptimas, algunas esporas pueden infectar con tan sólo dos horas la humedad, aunque la infección aumenta significativamente con una duración



de 6 horas o más (Aegerter *et al.*, 2003). A bajas temperaturas se requiere más tiempo de humedad (pe. 8 horas a 10°C).

La colonización de los tejidos del hospedante puede darse bajo una amplia gama de condiciones, aunque el período de latencia (tiempo que transcurre desde la infección hasta la esporulación) puede variar con la temperatura. Cuando las hojas desprendidas se inocularon y se incubaron a temperatura constante, la esporulación se inicia 7-8 días después de la inoculación, cuando la incubación fue a 10°C, mientras que a los 15, 20 o 25°C la esporulación se inició 4-5 días después de la inoculación (Aegerter *et al.*, 2003). A los 5°C, sin esporulación los síntomas fueron visibles después de 10 días, sin embargo, cuando las hojas estaban a temperaturas más altas, los síntomas pronto se hicieron visibles (Aegerter *et al.*, 2003.). Esto sugiere que a temperaturas de 5°C no se previene la colonización de las hojas pero no se evita la aparición de síntomas y esporulación (Aegerter, 2001), por lo que el período latente varía un poco por el aislamiento.

El mildiú se presenta más comúnmente en áreas de producción templadas y húmedas. Es más agresivo en climas húmedos y en temperaturas de 18-22°C. Aunque Rebollar-Alviter (2010 comunicación personal) indica que en la zona productora de zarzamora en el estado de Michoacán, las mayores incidencias de la enfermedad se han presentado en temperaturas entre los 15 y 22°C con humedades superiores al 85%. Estas condiciones se cumplen durante la temporada de lluvias y hasta Octubre y Noviembre en algunas zonas de Michoacán como Atapan, Los Reyes, Tangancícuaro y Ziracuaretiro. El patógeno inverna como micelio dentro de las raíces, coronas y cañas. Cuando los chupones comienzan a brotar en primavera, el hongo que está presente en el ápice de las cañas, infecta nuevos brotes y las nuevas hojas.

5.6.5 Manejo Integrado de la enfermedad

Se recomienda utilizar material libre de la enfermedad y se debe evitar las plantaciones en terrenos donde se tenga conocimiento que existieron infecciones de la enfermedad (Gluber, 1991). Se deben destruir hospedantes



alternos como rosales y zarzamoras silvestres. Además de remover los chupones y malezas para reducir la humedad en la base de la planta, ya que se estará ayudando a prevenir las condiciones favorables para que ocurra la infección. Las cañas viejas deben ser removidas y destruidas inmediatamente después de la cosecha para reducir las fuentes de inóculo. En la producción de zarzamora, se recomienda eliminar los retoños y primocañas pronto para limitar la producción de inóculo inicial. Tan pronto como sea posible después de la cosecha, las floricañas deberán ser retiradas y destruidos mediante incineración o enterramiento para reducir la acumulación de inóculo (Gubler, 1991). En California, un tratamiento de agua caliente 44°C durante 15 min., de las estacas disminuyeron eficazmente la enfermedad (Aegerter *et al.*, 2002). Para limitar la duración del agua libre en el follaje, se debe evitar el riego por aspersión (O'Neill *et al.*, 2002). Además, mantener un buen control de malezas puede reducir la humedad y la duración de la misma en el follaje. En los invernaderos que se proporcione ventilación adecuada y se mantenga la temperatura elevada durante un tiempo si es posible (por encima de 27°C). En presencia de niebla, las plantas deben ser vigiladas cuidadosamente para detectar signos de enfermedad, ya que este ambiente es muy propicio.

Las aplicaciones de fungicidas durante la primavera protegen de posibles infecciones el nuevo follaje, flores y frutos en desarrollo. Con aplicaciones de fungicidas sistémicos como el metalaxyl, utilizado en plantaciones de *Rubus* comerciales de California y Nueva Zelanda se han obtenido muy buenos resultados de control. Sin embargo, hay que tener especial cuidado con este fungicida ya que desde que el mildiú ha desarrollado en otros cultivos resistencia al metalaxyl, es importante que este fungicida no sea utilizado para tratamiento en los viveros; de otra manera el riesgo de selección y diseminación de nuevas cepas de *P. sparsa* con resistencia a este grupo químico al que pertenece el metalaxyl puede ser sustancialmente incrementada (Strik, 1996).

Sin embargo *P. sparsa* se considera como especie en riesgo medio a desarrollar resistencia a los fungicidas de acuerdo con el Comité de Acción de



Resistencia a Fungicidas (2005). Para minimizar el riesgo de desarrollar resistencia a fungicidas, los diferentes grupos de fungicidas se deben rotar entre sí. Las agrupaciones se basan en el modo de acción del fungicida, una "M" en el código indica un fungicida con un modo múltiple de sitio de acción. Fungicidas en el grupo 4; mefenoxam / metalaxil-M y oxadixyl, tienen un riesgo particularmente alto de desarrollar la resistencia y debe ser combinado con otro fungicida cuando se utiliza como una aplicación foliar. Fungicidas con eficacia demostrada contra el mildiú en *Rosa* y/o *Rubus* incluyen Azoxystrobin, clorotalonil, cimoxanil + mancozeb + oxadixyl, dimetomorf diclofluanida + mancozeb, mancozeb, fluazinam, fosetil-aluminio, mefenoxam o metalaxil-M, ácido fosfórico, propamocarb y trifloxistrobina.

Fungicidas de contacto como el clorotalonil se debe aplicar de manera preventiva, antes de la aparición de la enfermedad, para obtener mejores resultados (Kokko *et al.*, 1999; Hagan *et al.*, 2000; Aegerter, 2001; Daughtrey y Tobiasz, 2001; Elmhirst *et al.*, 2000; Aegerter *et al.*, 2002; O' Neill *et al.*, 2002).

No obstante para el manejo de oomycetes en frutillas se recomienda hacer aplicaciones con productos como fosetyl-Al (tener cuidado de no mezclar con productos que contengan cobre o con surfactantes), o realizar aplicaciones con productos como el mefenoxam o ácido fosforoso u otros fosfitos (Antonelli *et al.*, 2008).

En el uso racional de fungicidas debe ser considerado el tiempo y su papel en el impulso de los brotes de la enfermedad. Se han realizado modelos de predicción del mildiú para los sistemas de producción a nivel de vivero en el sur de California (USA), pero puede no ser adecuado para otros sistemas de producción (Aegerter *et al.*, 2003). En cuanto a la detección e inspección, esta debe hacerse en el follaje y los tallos de las zonas decoloradas. Como *P. sparsa* es un parásito obligado y no puede ser cultivado, la detección debe basarse en la inspección visual o pruebas basadas en ADN. Aunque la microscopía puede ser muy útil en la detección de micelio u oosporas en los



tejidos vegetales en reposo vegetativo, esto puede ser demasiado exigente como un método de inspección de rutina.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Descripción de las áreas de estudio

La presente investigación se desarrolló en los lugares de mayor superficie cultivada de zarzamora en el estado de Michoacán (Figura 4).

Atapan se localiza en el municipio de Los Reyes en las coordenadas $19^{\circ}39'.06''$ de latitud norte y $102^{\circ}25'.86''$ de longitud oeste, a una altura de 1,971 msnm.

Huatarillo, Municipio de Peribán se localiza en las coordenadas $19^{\circ}33'.98''$ de latitud norte y $102^{\circ}27'.59''$ de longitud oeste a una altura de 1300 msnm con una precipitación pluvial anual de 900 mm y temperaturas que oscilan de 15 a 3°C .

Zirimícuaro, Municipio de Ziracuaretiro, se localiza en la parte central del estado de Michoacán en las coordenadas $19^{\circ}23'.80$ de latitud norte y $101^{\circ}57'.78''$ de longitud oeste, a una altura de 1254 msnm. Su clima es tropical con lluvias en verano. Tiene una precipitación pluvial anual de 1200 mm y temperaturas que oscilan entre 8.0 y 37.0°C .

Tacámbaro se localiza en las coordenadas $19^{\circ} 14' 08''$ de latitud Norte y $101^{\circ} 07' 25''$ de longitud Oeste a una altura de 1640 msnm circundada de bosques tiene clima templado; es considerada como "la puerta de entrada de tierra caliente".

Ario de Rosales se localiza al centro sur del estado entre las coordenadas $19^{\circ} 12'$ latitud norte y $101^{\circ} 40'$ longitud oeste; a una altura de 1,910 msnm. El clima del municipio es templado con lluvias en verano, sin cambio térmico invernal bien definido. La temperatura media anual es de 25°C con máxima de 28.9°C y mínima de 9.5°C . El régimen de lluvias se registra entre los meses de mayo y agosto, contando con una precipitación media de los 761.6 mm.



Figura 4. Localización geográfica de las zonas de estudio Ziracuaretiro, Los Reyes, Tacámbaro y Ario de Rosales.

6.2 Colecta de Material vegetal

El material vegetal se colectó en parcelas comerciales de zarzamora cultivada (plántulas y plantas en producción) y silvestre. Se realizó un muestreo en zigzag, tomando aproximadamente 5 hojas de la parte media de planta, en plantas sintomáticas y asintomáticas por sitio, la primera colecta se realizó el 5 de Abril de 2010. Se colectó en el municipio de Ziracuaretiro, Michoacán, México.

La segunda colecta se llevó a cabo los días 27, 28, y 29 de julio del 2010, en los municipios de: Ziracuaretiro, Los Reyes, Atapan, Huatarillo, Ario de Rosales y Tacámbaro Michoacán, México.

Las muestras se transportaron en un contenedor con hielo y fueron depositadas en bolsas debidamente etiquetadas, las cuales posteriormente se trasladaron a un refrigerador tipo REVCO a -80°C para su mejor conservación y su posterior análisis.



6.2.1 Zarzamora cultivada

En material cultivado se llevó a cabo un muestreo en zigzag, tomando aproximadamente 5 hojas por planta y a su vez 3 plantas por sitio o parcela, esto tanto en parcelas con material sintomático como asintomático. Teniendo así un total de 10 sitios o parcelas de material sintomático y además con material asintomático de todos los municipios.

6.2.2 Material vegetal

En material de plántulas se tomaron 3 muestras por sitio en zigzag muestreando en los municipios de Ziracuaretiro, Tacámbaro y los Reyes.

6.2.3. Silvestre y plantas asociadas

Se colectó en 2 sitios plantas silvestres de zarzamora en los municipios de Ario de Rosales y Tacámbaro. En otro sitio perteneciente al municipio de Ario de Rosales se colectó una planta asociada (Maleza) presente en una parcela comercial de zarzamora. Y por último, se colectó plantas de Rosal en un sitio perteneciente al municipio de Ziracuaretiro.

6.3 Extracción de ADN

Se utilizó el protocolo de Doyle & Doyle (1990) para la obtención de ADN genómico CTAB, con algunas modificaciones para obtener un ADN de mejor calidad en *Rubus* sp. Con este método se obtienen de 50 a 100 μ g de ADN por cada 100 mg de tejido liofilizado y molido.

Se realizó la molienda del tejido, en morteros de porcelana, con la adición de Nitrógeno líquido (Figura 5A). Previamente a esto se calentó la solución amortiguadora (CTAB) a 65°C en baño maría, posteriormente se colocaron aproximadamente 100 mg de tejido molido (adicionando previamente 0.5 g de PVP) en un tubo de 2 mL, al cual se le agregó 1 mL de solución amortiguadora CTAB (Figura 5B). Se mezcló por inversión, para homogenizar el tejido con la solución amortiguadora (Figura 5G).



Posteriormente se incubaron los tubos previamente etiquetados en un horno a 65 °C durante 90 min (Figura 5F). Se retiraron los tubos del horno y se dejaron enfriar durante 5 a 10 min, para después agregar 500 µL de cloroformo: octanol (24:1). Se agitaron los tubos por inversión durante 10 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 3500 rpm a temperatura ambiente durante 10 min para formar la fase acuosa (líquido claro de color amarillo) y la fase orgánica (de color verde oscuro). De ahí, se recuperó aproximadamente 750 µL de la fase superior acuosa y se vació en un tubo nuevo de 1.5 mL. Se repitió el tratamiento con cloroformo en la fase acuosa para obtener ADN más puro, aunque en menor cantidad. Después se agregó 1/2 volumen de isopropanol (2-propanol) al 100% previamente enfriado en un refrigerador a -20°C. Se mezcló por inversión para favorecer la precipitación del ADN. A continuación se centrifugó a 3500 rpm a temperatura ambiente durante 30 min para precipitar y formar la pastilla de ADN en el fondo del tubo. Se desechó el isopropanol por decantación y se agregó 1 mL de alcohol al 75%. Se lavó suavemente la pastilla de ADN. Se desechó el alcohol por decantación y se repitió el lavado. Se dejó que el alcohol se evaporará a temperatura ambiente hasta que la pastilla se secó. Finalmente, se resuspendió la pastilla en 50 µL de Elution Buffer. Se guardaron las muestras a -20°C hasta utilizarlas (CIMMYT, 2006).

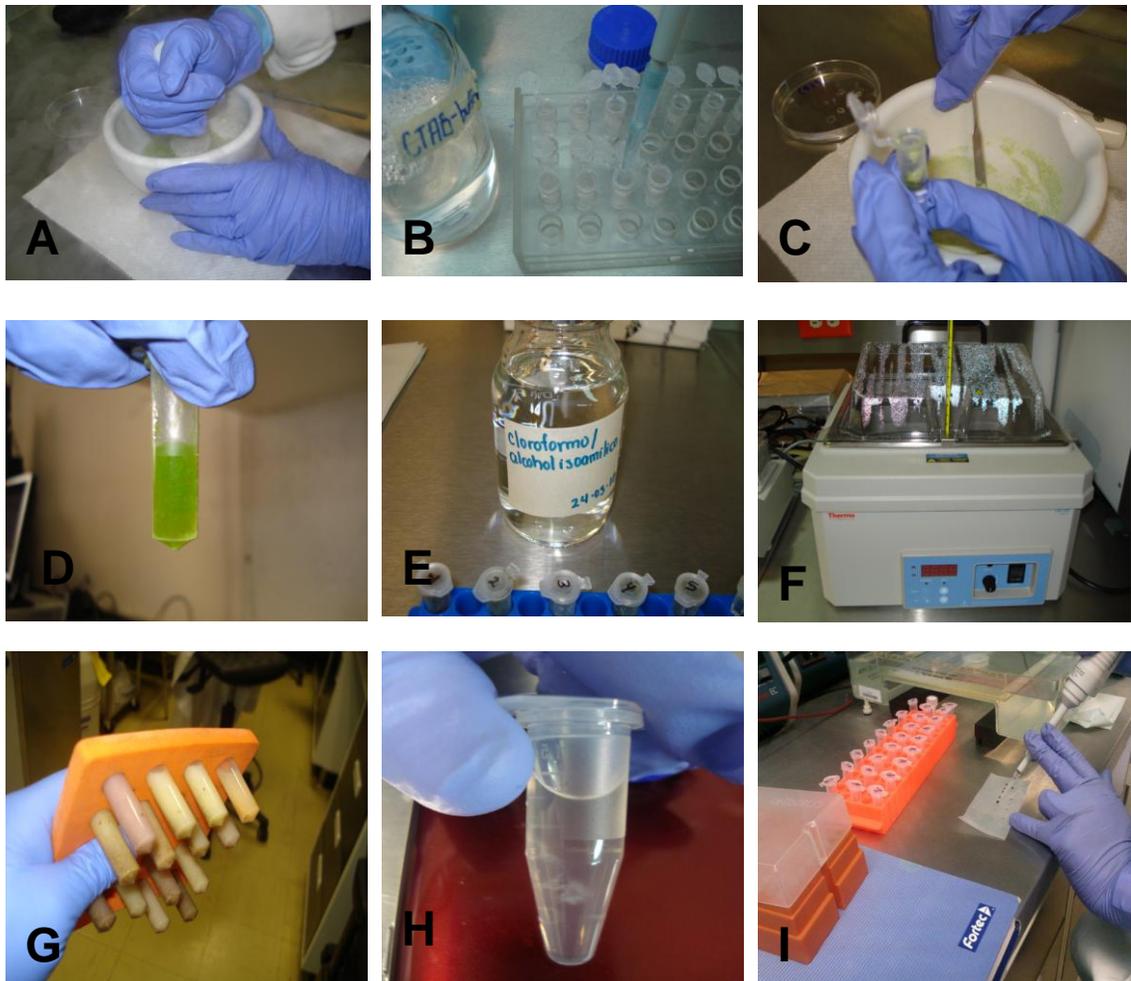


Figura 5. Proceso y material utilizado en la Extracción de ADN a partir de plantas de zarzamora. **A.** Molienda de material vegetal. **B.** Adición de CTAB. **C.** Material vegetal molido. **D.** Material vegetal en CTAB. **E.** Cloroformo-alcohol isoamílico, usado para separación de fases. **F.** Baño maría. **G.** Muestras a las que se le agrego Cloroformo-alcohol isoamílico. **H.** Tubo con ADN genómico. **I.** Preparación de muestras para electroforesis.

6.4 Cuantificación de ADN

Todas las muestras se cuantificaron en un espectrofotómetro Nano Drop 2000c de BIORAD® (Figura 6) y se determinó la relación 260/280 nm que nos indica la calidad del ADN, si este se encuentra libre de proteínas y la relación 260/230 nm que nos indica la presencia o ausencia de fenoles.



Figura 6. Nano Drop 2000c de BIORAD®

6.5 Detección por PCR

Se realizó la identificación filogenética de la muestras amplificando la región ITS (espacio transcrito interno) de los genes ribosomales (ADN ribosomal) mediante la técnica de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de acuerdo a los protocolos del laboratorio de Biotecnología y Bioquímica de Semillas del Colegio de Postgraduados.

Se realizó un PCR anidado; donde en la primer PCR se utilizaron los primers específicos PS3 (5' ATT TTG TGC TGG CTG GC 3') y PSI (5' TGC CAC ACG ACC GAA GC 3'), diseñados por Aegerter et al. (2002) para amplificar la región ITS1, 5.8S e ITS2 del ADN ribosomal de *P. sparsa*. Las reacciones de PCR consistieron de 2 μL de cada primer (10 pM cada uno), 5 μL de Buffer 1x, 12.8 μL de agua HPLC 0.2 μL de *Taq* ADN polimerasa (Promega, USA), 2 μL de cada dNTP, 1 μL de ADN para un volumen total de 25 μL (Figura 7A). Las amplificaciones se realizaron en un termociclador (BIORAD®-ADN Engine) y consistieron de una desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, seguida por 39 ciclos de 94°C por 2 min, 56°C por 2 min, 72°C por 2.5 min y un periodo final de extensión a 72°C por 10 min (Figura 7B).

Luego de la reacción, se realizó una segunda PCR, en donde se tomaron 1 μL de los productos de reacción previamente diluidos 1/80 en agua HPLC y se

llevó cabo una segunda PCR con los primers específicos PR3 (5'GGCTGGCTGCTACTGGGCA-3') y PR4 (5'GCCGACTGGCCACGCGGA-3') diseñados por Linqvist *et al.* (1998) (Figura 7C). Las condiciones de PCR fueron las mismas que la anterior con la diferencia de que se tomó 1 μ L de ADN previamente diluido de la primera reacción obtenida (Figura 7D).

Los productos amplificados fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% adicionando buffer TAE a una concentración de 1X. Un marcador molecular de 1Kb fue incluido. La visualización de las bandas se realizó bajo luz ultravioleta utilizando el sistema digital de análisis (INFINITY).



Figura 7. Proceso y material utilizado en el PCR anidado a partir de plantas de zarzamora. **A.** Preparación y colocación de Solución maestra a los respectivos tubos. **B.** Termociclador BIORAD®-ADN Engine. **C.** Muestras previamente etiquetadas y preparadas. **D.** Colocación de muestras en el termociclador, con las condiciones anteriormente mencionadas para *P. sparsa*.

Adicionalmente a la confirmación taxonómica se utilizó la secuenciación de algunos productos de PCR obtenidos. Para esto, se purificaron los amplicones del ADN de aproximadamente 477 bp que a su vez fueron limpiados con el kit QIAQUICK (QIAGEN, USA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante y se enviaron a secuenciar al Colegio de Postgraduados en ambas direcciones mediante el *kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Applied Biosystems, Foster City, EEUU)* y su análisis en un secuenciador 3130 *Applied Biosystems* de la compañía Macrogen (Corea del Sur). Las secuencias obtenidas fueron ensambladas con el *software BioEdit* (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>), y comparadas con la base de

datos del *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) utilizando el programa BLAST, para determinar si en efecto se trataba del patógeno *P. sparsa*.

6.6 Establecimiento de experimento en campo

Para conocer el efecto del fosfito aplicado en diferentes etapas fenológicas, se estableció un experimento en una parcela comercial en Zirimícuaro, Ziracuaretiro de la variedad Tupy, de aproximadamente 5 años de edad, recién defoliada (30 de Junio de 2010), la cual fue manejada por el productor, excepto que en la parcela experimental no se realizaron aplicaciones de fungicidas (Figura 8 y 9C).

A			B			C			D			E		
3	1	5	2	8	3	6	1	2	5	4	6	3	7	1
4	8	7	5	7	1	8	5	3	7	1	3	8	2	6
6	2	6	4	4	7	2	8	4	5					

Figura 8. Arreglo de la parcela experimental donde se llevaron a cabo las aplicaciones con Fosfito de potasio (Supa Active^R). A dosis de 3.5 L ha⁻¹, de acuerdo al programa de aplicaciones indicado en el (Cuadro 1). Las letras indican las repeticiones del experimento.



Figura 9. Proceso y material utilizado en la aplicación de Fosfito de potasio a los diferentes tratamientos de plantas de zarzamora. **A.** Medición de la cantidad adecuada de Fosfito de potasio para la aplicación. **B.** Incorporación del producto en la Mochila de aspersión. **C.** Aplicación de Fosfito de potasio a los diferentes tratamientos.



6.7 Tratamientos y diseño experimental

El experimento consistió en un diseño de bloques completos al azar con 5 repeticiones (Figura 8). Cada repetición consistió de 5 a 7 m lineales de seto. Cada unidad experimental consistió de 5 a 7 m de seto de cultivo, realizando las aplicaciones con el máximo cubrimiento con una aspersora manual aplicando un gasto aproximado de 500 L ha^{-1} , evitando al máximo el traslape con las unidades experimentales adyacentes. Se evaluaron 7 tratamientos y 1 testigo que consistieron de diferentes programas de manejo basados en aplicaciones de fosfito de potasio (48.6% de ácido fosforoso) a una dosis de 3.5 L ha^{-1} de acuerdo al programa de aplicaciones indicado en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Calendario de aplicaciones de Fosfito de potasio (Supa Active®) sobre las diferentes etapas fenológicas del cultivo de zarzamora en una parcela comercial.

Tratamiento	Etapas Fenológicas	Fecha de aplicación	No. aplicación
1	Defoliación-Desarrollo vegetativo.	31/07/2010	
		12/08/2010	3
		26/08/2011	
2	Defoliación-Inicio de floración	31/07/2010	
		12/08/2010	3
		26/08/2011	
3	Defoliación-5 % fruto verde	31/07/2010	
		12/08/2010	4
		26/08/2011	
4	Defoliación- Cosecha	08/09/2010.	
		31/07/2010	
		12/08/2010	
		26/08/2010	
		08/09/2010.	7
5	5 % Floración-Cosecha	24/09/2010.	
		05/10/2010	
		27/10/2010	
		08/09/2010.	4
6	6 % Floración-5 % Fruto	24/09/2010.	
		05/10/2010	
		27/10/2010	
		08/09/2010.	



verde			
		24/09/2010.	2
7	50 % desarrollo de fruto- Cosecha	05/10/2010	
		18/10/2010	3
		27/10/2010.	
8*	Testigo	-----	-----

6.8 Variables evaluadas

Se evaluó la incidencia de la enfermedad en frutos cuantificando todos los frutos sanos y enfermos del metro central de cada unidad experimental en dos evaluaciones. La incidencia y severidad en hojas no se determinó de manera visual debido a que los síntomas típicos de la enfermedad no se manifestaron. A fin de determinar si el fungicida fue capaz de eliminar el patógeno del interior de los tejidos en cada tratamiento, se colectó material vegetal (hojas asintomáticas) antes de la aplicación con fosfito de potasio, tomándose de 3 a 5 hojas de la parte media de la planta, del centro de cada una de las unidades experimentales (40 unidades) en Zirimícuaro, Ziracuaretiro. Así mismo se realizó otra colecta a mitad del experimento en la fecha del 27 de septiembre del 2010, tomándose hojas asintomáticas de la parte media de la planta, del centro de las unidades experimentales a colectar, haciendo un total de 20 unidades experimentales.

Por último se colectaron frutos asintomáticos de las 40 unidades experimentales totales en la fecha del 4 de noviembre e 2010 y se procesaron en el laboratorio por PCR con fines de detectar la presencia del patógeno en las diferentes unidades experimentales.

6.9 Análisis de datos

A fin de cumplir con los supuestos estadísticos, los datos se transformaron a $\arcsen \sqrt{x}$ a fin de estabilizar la varianza y posteriormente se realizó una prueba de homogeneidad de varianzas de Leven. Los datos de incidencia de la



enfermedad en frutos, se sometieron a un análisis de varianza (Proc Mixed de SAS ver 9.2) y posteriormente a una prueba de medias (LSD $\alpha = 0.05$) para detectar los mejores tratamientos y su agrupamiento.

Las medias se transformaron nuevamente a su valor correspondiente de incidencia en proporción.

VII. RESULTADOS

7.1 Optimización del protocolo de detección del Oomycete.

Del protocolo para aislamiento de ADN genómico (CTAB), se hicieron algunas modificaciones favorables para la obtención de un ADN de mejor calidad. Funcionando para esto la adición durante la molienda de 0.5 g de polivinilpirrolidona (PVP), además de repetir el tratamiento de lavado con cloroformo de la fase acuosa, con precaución de no tocar la nata intermedia entre la fase acuosa y la fase orgánica que se forma.

En todas las extracciones se incubaron siempre las muestras durante toda la noche a -20° C, esto hizo más eficiente la precipitación del ADN. Se realizó la repetición del lavado con alcohol al 70% para obtener ADN más limpio.

Finalmente, se realizó la electroforesis para ver la integridad del ADN genómico (Figura 10), corroborando así que el ADN se encontraba en buenas condiciones para realizar las pruebas siguientes. Además de cuantificarlo en un espectrofotómetro Nano Drop 2000c de BIORAD® teniendo concentraciones mayores a los 100 ng/ μ L en cada una de las muestras analizadas y observando buena calidad de este ADN en base a las relaciones antes mencionadas.

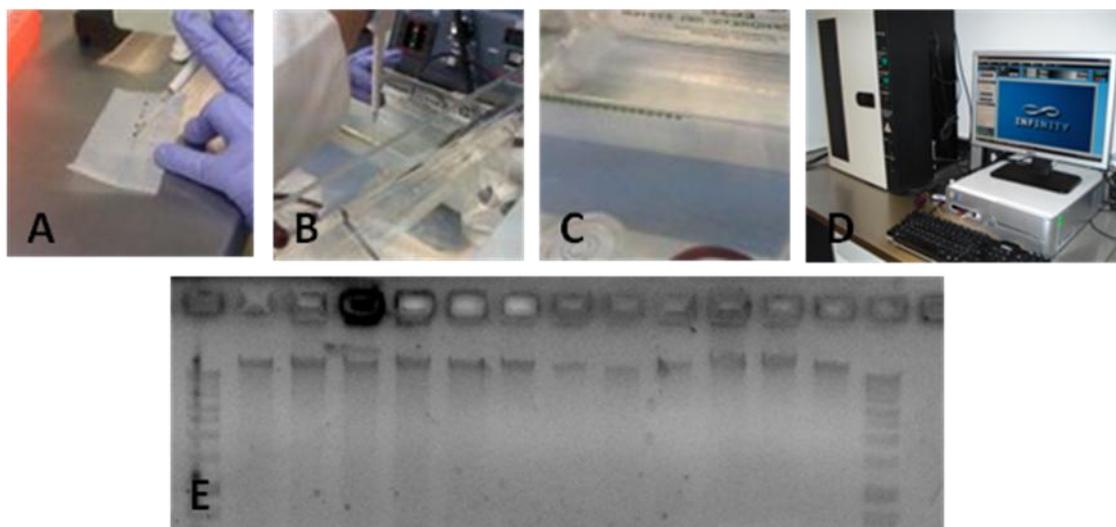


Figura 10. Proceso, material utilizado y electroforesis para ver la integridad del ADN. **A.** Incorporación del colorante en las muestras con ADN genómico total. **B.** Adición de las muestras respectivas en el Gel de agarosa. **C.** Muestras listas para la electroforesis. **D.** Fotodocumentador. **E.** Bandas que muestran la integridad del ADN genómico total.

7.2 Detección de *Peronospora sparsa* por PCR anidado en los diferentes Municipios, con diversos materiales vegetales.

La detección de *P. sparsa*, en base a primers utilizados anteriormente por Aegerter *et al.*, 2000 (PS3/PS1) en plantas de rosa y por Linqvist *et al.*, 1998 (PR3/PR4) realizando para esto un PCR anidado incorporando una dilución en la segunda reacción de 1/80 dieron resultados positivos a partir de hojas de zarzamora sintomáticas y asintomáticas, así como también de fruto sintomático y asintomático.

En la colecta realizada el 5 de Abril de 2010, en el municipio de Ziracuaretiro, se analizaron hojas sintomáticas y asintomáticas, e incluso de plantas jóvenes resultando positivas en la detección (Figura 11).

Cuadro 2. Datos de las muestras colectadas en la primera fecha en el municipio de Ziracuairetiro indicando datos de los materiales vegetales así como su diagnóstico.

MUESTRAS	TPO DE MUESTRAS	HOSPEDANTE	SINTOMATOLOGÍA	FECHA	MUNICIPIO	LUGAR DE COLECTA	COORDENADAS	ALTITUD	DIAGNÓSTICO
1	*H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	*A	5/04/2010	Ziracuairetiro	*PC	19°23'.80" N 101°57'.78" W	1254 msnm	+
2	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	A	5/04/2010	Ziracuairetiro	PC	19°23'.80" N 101°57'.78" W	1254 msnm	+
3	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	A	5/04/2010	Ziracuairetiro	PC	19°23'.80" N 101°57'.78" W	1254 msnm	+
4	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	A	5/04/2010	Ziracuairetiro	PC	19°23'.80" N 101°57'.78" W	1254 msnm	+
5	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	A	5/04/2010	Ziracuairetiro	PC	19°23'.80" N 101°57'.78" W	1254 msnm	+
6	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	S	5/04/2010	Ziracuairetiro	PC	19°23'.80" N 101°57'.78" W	1254 msnm	+
7	H	<i>Rubus</i> sp. Var. Tupy	S	5/04/2010	Ziracuairetiro	PC	19°23'.80" N 101°57'.78" W	1254 msnm	+
8	H	<i>Rubus</i> sp. Var. Tupy	S	5/04/2010	Ziracuairetiro	PC	19°23'.80" N 101°57'.78" W	1254 msnm	+
9	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	S	5/04/2010	Ziracuairetiro	PC	19°23'.80" N 101°57'.78" W	1254 msnm	+
10	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	S	5/04/2010	Ziracuairetiro	PC	19°23'.80" N 101°57'.78" W	1254 msnm	+
11	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	S	5/04/2010	Ziracuairetiro	PC	19°23'.80" N 101°57'.78" W	1254 msnm	+
12	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	S	5/04/2010	Ziracuairetiro	PC	19°23'.80" N 101°57'.78" W	1254 msnm	+



13	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	S	5/04/2010	Ziracuaretiro	PC	19°23'.80" N 101°57'.78" W	1254 msnm	+
14	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	S	5/04/2010	Ziracuaretiro	PC	19°23'.80" N 101°57'.78" W	1254 msnm	+
15	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	S	5/04/2010	Ziracuaretiro	PC	19°23'.80" N 101°57'.78" W	1254 msnm	+
16	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	S	5/04/2010	Ziracuaretiro	PC	19°23'.80" N 101°57'.78" W	1254 msnm	+
17	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	S	5/04/2010	Ziracuaretiro	PC	19°23'.80" N 101°57'.78" W	1254 msnm	+
18	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	S	5/04/2010	Ziracuaretiro	PC	19°23'.80" N 101°57'.78" W	1254 msnm	+
19	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	S	5/04/2010	Ziracuaretiro	PC	19°23'.80" N 101°57'.78" W	1254 msnm	+
20	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	S	5/04/2010	Ziracuaretiro	PC	19°23'.80" N 101°57'.78" W	1254 msnm	+
21	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	S	5/04/2010	Ziracuaretiro	PC	19°23'.80" N 101°57'.78" W	1254 msnm	+
22	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	S	5/04/2010	Ziracuaretiro	PC	19°23'.80" N 101°57'.78" W	1254 msnm	+
23	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	S	5/04/2010	Ziracuaretiro	PC	19°23'.80" N 101°57'.78" W	1254 msnm	+
24	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	S	5/04/2010	Ziracuaretiro	PC	19°23'.80" N 101°57'.78" W	1254 msnm	+
25	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	S	5/04/2010	Ziracuaretiro	PC	19°23'.80" N 101°57'.78" W	1254 msnm	+

*H=Hoja *A=Asintomática S=Sintomática ODC= Orilla de Carretera PC=Parcela comercial
PCV=Parcela Comercial Vivero

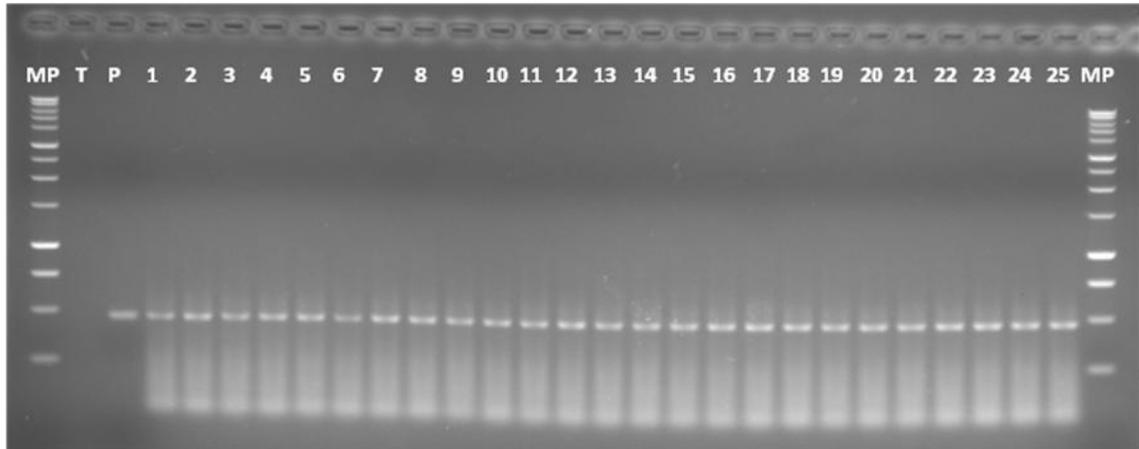


Figura 11. MP= Marcador de peso de 1Kb. PCR anidado con los primers PR3/PR4 en dilución 1/80, siguiendo las condiciones de Aegerter y colaboradores. T= testigo negativo. P= testigo positivo (muestras secuenciada de *P. sparsa*). Carriles 1-5; Hojas asintomática (Ziracuaretiro, Mich). Carriles 6-12; Hoja sintomáticas (Ziracuaretiro, Mich). Carriles 13-19 Hojas sintomáticas (Ziracuaretiro, Mich). Carriles 20-21 Hojas jóvenes asintomáticas. Carriles 22-25 Hojas sintomáticas (Ziracuaretiro, Mich).

La segunda colecta se llevó a cabo los días 27, 28, y 29 de julio del 2010

Cuadro 3. Datos de las muestras colectadas de los diferentes municipios indicando datos de los diferentes materiales vegetales así como su diagnóstico.

MUESTRAS	TIPO DE MUESTRA	HOSPEDANTE	SINTOMATOLOGÍA	FECHA	MUNICIPIO	LUGAR DE COECTA	COORDENADAS	ALTITUD	DIAGNÓSTICO
1	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	S	27/07/2010	Ziracuaretiro	PCV	19°23'.80 " N 101°57'.78" W	1254 msnm	+
2	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	S	27/07/2010	Ziracuaretiro	PCV	19°23'.80 " N 101°57'.78" W	1254 msnm	+
3	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	S	27/07/2010	Ziracuaretiro	PCV	19°23'.80 " N 101°57'.78" W	1254 msnm	+
4	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	A	27/07/2010	Ziracuaretiro	PCV	19°23'.80 " N 101°57'.78" W	1254 msnm	+
5	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	A	27/07/2010	Ziracuaretiro	PCV	19°23'.80 " N 101°57'.78" W	1254 msnm	+

6	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	A	27/07/2010	Ziracuaretiro	PCV	19°23'.80" N 101°57'.78" W	1254 msnm	+
7	H	<i>Rosa</i> sp. Rosal	A	27/07/2010	Ziracuaretiro	PC	19°23'.80" N 101°57'.78" W	1254 msnm	+
8	H	<i>Rosa</i> sp. Rosal	A	27/07/2010	Ziracuaretiro	PC	19°23'.80" N 101°57'.78" W	1254 msnm	+
9	H	<i>Rosa</i> sp. Rosal	A	27/07/2010	Ziracuaretiro	PC	19°23'.80" N 101°57'.78" W	1254 msnm	+
10	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	A	28/07/2010	Ario de Rosales	PC	19°10'04" N 101°43'35" W	1520 msnm	+

*H=Hoja *A=Asintomática S=Sintomática ODC= Orilla de Carretera PC=Parcela comercial PCV=Parcela Comercial Vivero

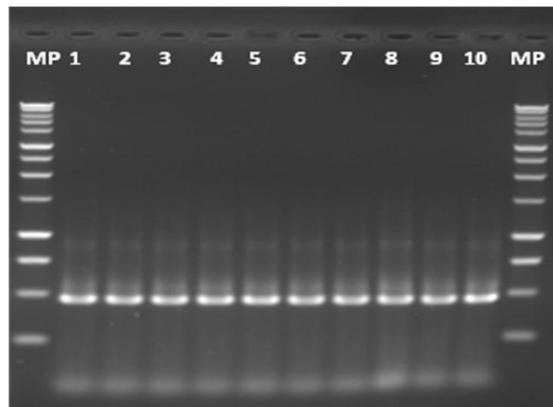


Figura 12. MP= Marcador de peso de 1Kb. PCR anidado con los primers PR3/PR4 en dilución 1/80, siguiendo todas las condiciones de Aegerter y colaboradores. Carriles 1-3; Hojas sintomáticas (Ziracuaretiro, Mich). Carriles 4-6; Hojas asintomáticas (Ziracuaretiro, Mich). Carriles 7-9 Hojas de planta de Rosal asintomáticas, al lado de parcela comercial (Ziracuaretiro, Mich). Carril 10; Hoja asintomática de parcela comercial del Municipio de Ario de Rosales, Mich.



Cuadro 4. Datos de las muestras colectadas de los diferentes municipios indicando datos de los diferentes materiales vegetales así como su diagnóstico.

MUESTRAS	TIPO DE MUESTRA	HOSPEDANTE	SINTOMATOLOGÍA	FECHA	MUNICIPIO	SITIO	COORDENADAS	ALTITUD	DIAGNÓSTICO
1	H	<i>Rubus</i> sp. Var. Tupy	A	28/07/2010	Ario de Rosales	PC	19°10'04" N 101°43'35" W	1520 msnm	+
2	H	<i>Rubus</i> sp. Var. Tupy	A	28/07/2010	Ario de Rosales	PC	19°10'04" N 101°43'35" W	1520 msnm	+
3	H	<i>Rubus</i> sp. Var. Tupy	A	28/07/2010	Ario de Rosales	PC	19°10'04" N 101°43'35" W	1520 msnm	+
4	H	<i>Rubus</i> sp. Var. Tupy	S	28/07/2010	Ario de Rosales	PC	19°09'15" N 101°43'25" W	1523 msnm	+
5	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	S	28/07/2010	Ario de Rosales	PC	19°09'15" N 101°43'25" W	1523 msnm	+
6	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	S	28/07/2010	Ario de Rosales	PC	19°09'15" N 101°43'25" W	1523 msnm	+
7	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	S	28/07/2010	Ario de Rosales	PC	19°09'15" N 101°43'25" W	1523 msnm	+
8	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	S	28/07/2010	Ario de Rosales	PC	19°09'15" N 101°43'25" W	1523 msnm	+
9	H	<i>Desmodium intortum</i>	S	28/07/2010	Ario de Rosales	PC	19°09'15" N 101°43'25" W	1523 msnm	+
10	H	<i>Rubus adenotrichus</i>	A	28/07/2010	Ario de Rosales	OD C	19°10'44" N 101°42'21" W	1666 msnm	+
11	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	A	28/07/2010	Ario de Rosales	PC	19°10'12" N 101°43'40" W	1516 msnm	+
12	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	A	28/07/2010	Ario de Rosales	PC	19°10'12" N 101°43'40" W	1516 msnm	+

13	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	A	28/07/2010	Ario de Rosales	PC	19°10'12" N 101°43'40" W	1516 msnm	+
14	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	A	28/07/2010	Ario de Rosales	PC	19°10'12" N 101°43'40" W	1516 msnm	+
15	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	A	28/07/2010	Tacámbaro	PC	19°13'36" N 101°28'48" W	1587 msnm	+
16	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	A	28/07/2010	Tacámbaro	PC	19°13'36" N 101°28'48" W	1587 msnm	+
17	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	A	28/07/2010	Tacámbaro	PC	19°13'36" N 101°28'48" W	1587 msnm	+
18	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	A	28/07/2010	Tacámbaro	PC	19°13'36" N 101°28'48" W	1587 msnm	+
19	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	S	28/07/2010	Tacámbaro	PCV	19°12'48" N 101°30'53" W	1579 msnm	+
20	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	S	28/07/2010	Tacámbaro	PCV	19°12'48" N 101°30'53" W	1579 msnm	+
21	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	A	28/07/2010	Tacámbaro	PCV	19°12'48" N 101°30'53" W	1579 msnm	+
22	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	A	28/07/2010	Tacámbaro	PCV	19°12'48" N 101°30'53" W	1579 msnm	+
23		<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	A	28/07/2010	Tacámbaro	PCV	19°12'48" N 101°30'53" W	1579 msnm	+

*H=Hoja *A=Asintomática S=Sintomática ODC= Orilla de Carretera PC=Parcela comercial PCV=Parcela Comercial Vivero

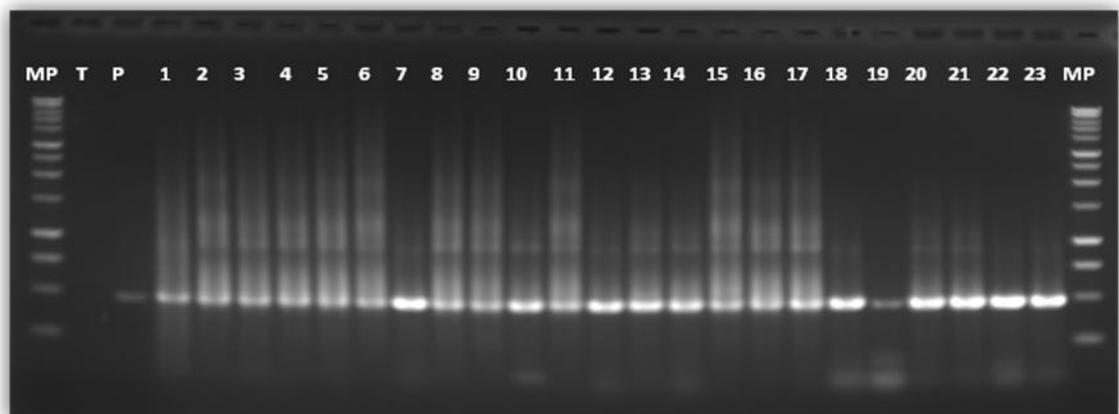


Figura 13. MP= Marcador de peso de 1Kb. PCR anidado con los primers PR3/PR4 en dilución 1/80, siguiendo las condiciones de Aegerter y colaboradores. Carriles 1-3; Hojas asintomáticas de parcela comercial (Ario de Rosales, Mich). Carriles 4-8; Hojas sintomáticas de parcela comercial (Ario de Rosales, Mich). Carril 9; Hojas de planta asociada al cultivo (Maleza) sintomática. Carril 10; Hojas de planta de zarzamora silvestre cercana al Municipio de Ario de Rosales, Mich. Carriles 11-14; Hojas



asintomáticas de parcela comercial (Ario de Rosales, Mich). Carriles 15-18; Hojas asintomáticas de parcela comercial (Tacámbaro, Mich). Carriles 19-20; Hojas sintomáticas de vivero comercial (Tacámbaro, Mich). Carriles 21-23; Hojas asintomáticas de vivero comercial (Tacámbaro, Mich).

Cuadro 5. Datos de las muestras colectadas de los diferentes municipios indicando datos de los diferentes materiales vegetales así como su diagnóstico.

MUESTRA	TIPO DEMUESTRA	HOSPEDANTE	SINTOMATOLOGÍA	FECHA	MUNICIPIO	LUGAR DE COELCTA	COORDENADAS	ALTITUD	DIAGNÓSTICO
1	H	<i>Rubus adenotrichus</i>	A	28/07/2010	Huatarillo Los Reyes	*ODC	19° 34'08" N 102°27'28"W	1344 msnm	+
2	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	S	28/07/2010	Huatarillo Los Reyes	*PSV	19° 34'08" N 102°27'28"W	1344 msnm	+
3	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	S	28/07/2010	Huatarillo Los Reyes	PSV	19° 34'08" N 102°27'28"W	1344 msnm	+
4	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	A	28/07/2010	Huatarillo Los Reyes	PSV	19° 34'08" N 102°27'28"W	1344 msnm	+
5	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	S	29/07/2010	Huatarillo Los Reyes	PC	19° 34'08" N 102°27'28"W	1344 msnm	+
6	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	S	29/07/2010	Huatarillo Los Reyes	PC	19° 34'08" N 102°27'28"W	1344 msnm	+
7	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	S	29/07/2010	Huatarillo Los Reyes	PC	19° 34'08" N 102°27'28"W	1344 msnm	+
8	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	S	29/07/2010	Huatarillo Los Reyes	PC	19° 34'08" N 102°27'28"W	1344 msnm	+
9	H	<i>Rubus</i> sp. var. Brazos	A	29/07/2010	Huatarillo Los Reyes	PC	19°37'27"N 102°29'15"W	1301 msnm	+
10	H	<i>Rubus</i> sp. var. Brazos	A	29/07/2010	Huatarillo Los Reyes	PC	19°37'27"N 102°29'15"W	1301 msnm	+
11	H	<i>Rubus</i> sp. var. Brazos	A	29/07/2010	Huatarillo Los Reyes	PC	19°37'27"N 102°29'15"W	1301msn m	+
12	H	<i>Rubus</i> sp. var. Brazos	A	29/07/2010	Huatarillo Los Reyes	PC	19°37'27"N 102°29'15"W	1301 msnm	+
13	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	A	29/07/2010	Atapan	PC	19°39'01"N 102°28'42"W	1405 msnm	+
14	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	A	29/07/2010	Atapan	PC	19°39'01"N 102°28'42"W	1405 msnm	+
15	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	A	29/07/2010	Atapan	PC	19°39'01"N 102°28'42"W	1405 msnm	+

16	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	A	29/07/2010	Atapan	PC	19°39'01"N 102°28'42"W	1405 msnm	+
17	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	S	29/07/2010	Atapan	PC	19°39'01"N 102°28'42"W	1405 msnm	+
18	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	S	29/07/2010	Atapan	PC	19°39'01"N 102°28'42"W	1405 msnm	+
19	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	S	29/07/2010	Atapan	PC	19°39'01"N 102°28'42"W	1405 msnm	+
20	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	A	29/07/2010	Atapan	PC	19°39'08"N 102°25'47"W	1562 msnm	+
21	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	A	29/07/2010	Atapan	PC	19°39'08"N 102°25'47"W	1562 msnm	+
22	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	A	29/07/2010	Atapan	PC	19°39'08"N 102°25'47"W	1562 msnm	+
23	H	<i>Rubus</i> sp. var. Tupy	A	29/07/2010	Atapan	PC	19°39'08"N 102°25'47"W	1562 msnm	+

*H=Hoja *A=Asintomática S=Sintomática ODC= Orilla de Carretera PC=Parcela comercial PCV=Parcela Comercial Vivero

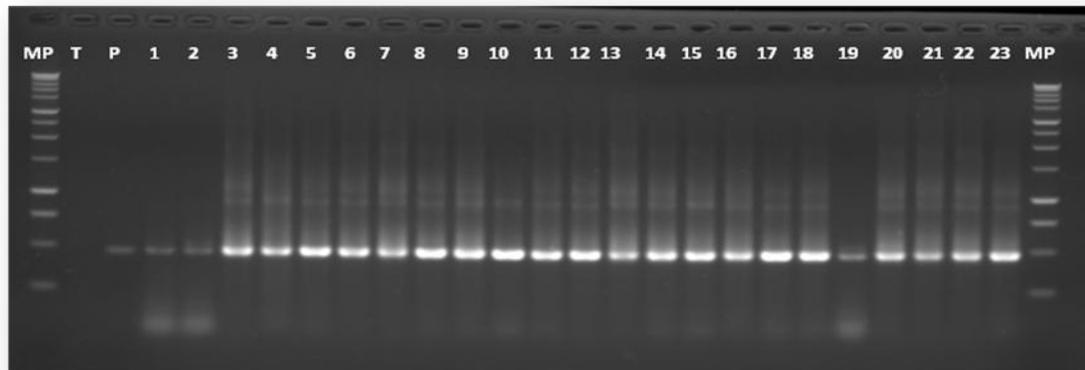


Figura 14. MP= Marcador de peso de 1Kb. PCR anidado con los primers PR3/PR4 en dilución 1/80, siguiendo las condiciones de Aegerter y colaboradores. Carril 1; Hojas asintomáticas de zarzamora silvestre (Cercano a Villa Madero, Mich). Carriles 2-3; Hojas sintomáticas de vivero comercial (Huatarillo, Los Reyes, Mich) Carril 4; Hoja asintomática de vivero comercial. Carril 5-8 sintomáticas de plantación comercial (Huatarillo, Los Reyes, Mich). Carriles 9-12; Hojas de planta asociada al cultivo (*Rubus* sp var. Brazos) asintomática. Carril 13-16; Hojas asintomáticas de plantación comercial de zarzamora, (Rancho Santino, Atapan, Mich). Carriles 17-19; Hojas sintomáticas de parcela comercial (Rancho Santino, Atapan, Mich). Carriles 20-23; Hojas asintomáticas de parcela comercial (Atapan, Mich).



7.3 Análisis Filogenético

Las amplificaciones realizadas de los genes ribosomales ITS, se llevaron a cabo exitosamente, se obtuvieron fragmentos de 477 bp en todas las muestras tanto de material sintomático como asintomático como se esperaba. Los resultados del BLASTN confirmaron que los síntomas de secamiento del fruto de la zarzamora (*Rubus* sp. var Tupy) pertenecen a *P. sparsa*. Estas regiones revelaron identidades de secuencias nucleotídicas de 99 a 100% para esta especie. La comparación se llevó a cabo con fragmentos de la misma longitud (477 pb) que fueron bajadas del GenBank-NCBI, así como secuencias de referencia de *P. sparsa* con número de accesoión EU369694, EU601170, EU601168, EU601171, EU601169.

Estas observaciones se confirmaron con los análisis filogenéticos de *P. sparsa*. Los resultados de los datos moleculares indicaron que del total de las muestras analizadas de zarzamora, 100% contenían el oomycete.

Las secuencias obtenidas de las muestras analizadas fueron agrupadas de la siguiente manera:

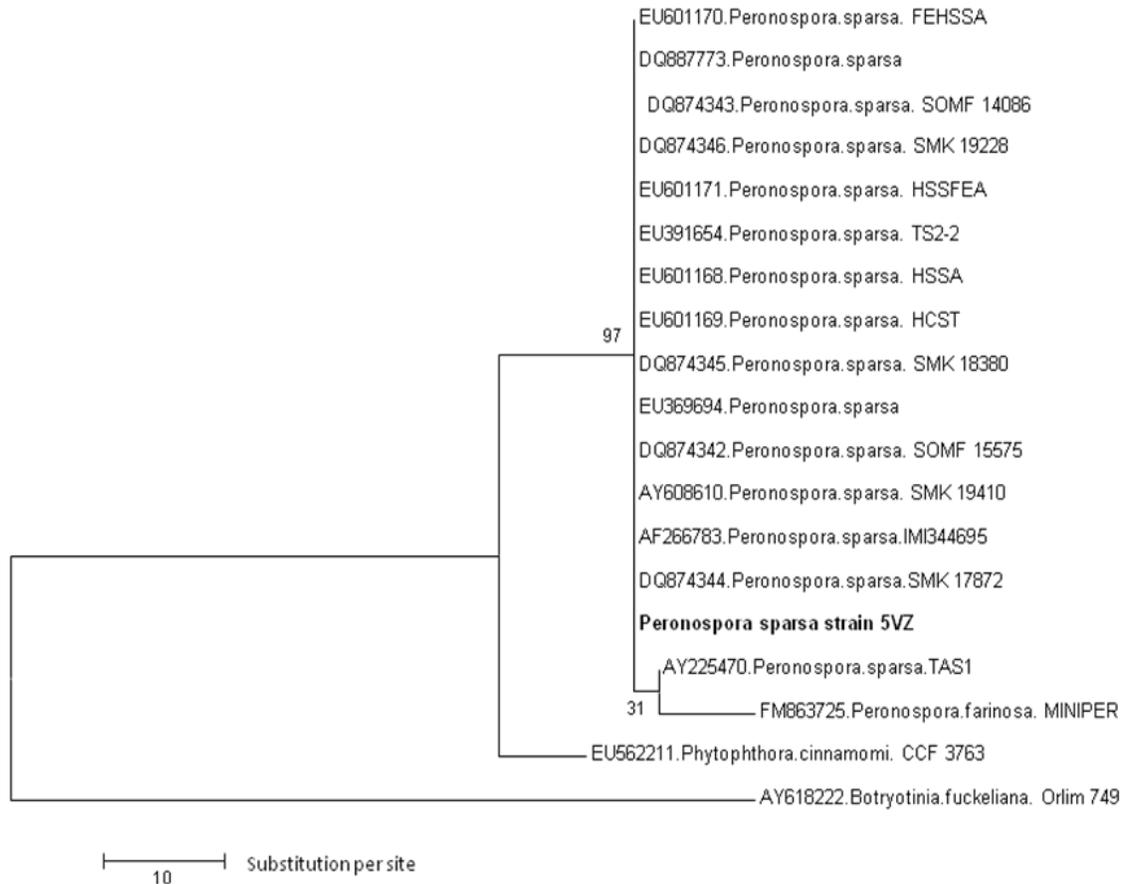


Figura 15. Árbol filogenético construido con el método de Máxima Parsimonia utilizando 1000 repeticiones bootstrap. Las secuencias corresponden a las amplificaciones de el espacio transcrito interno del rADN de *Peronospora sparsa*. *Botryotinia fuckeliana* fue considerada como fuera de grupo.

7.4 Efectos de tiempos de aplicación de Fosfito de Potasio en la incidencia del Mildiú

Los datos del experimento no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos ($P=0.28$) en la incidencia del secamiento del *berry*. El testigo alcanzo una incidencia superior al 30 %, mientras que la menor incidencia (numérica) estuvo asociada al tratamiento 5, el cual correspondió a 4 aplicaciones de fosfito de potasio iniciando a principios de la floración (Figura 16).

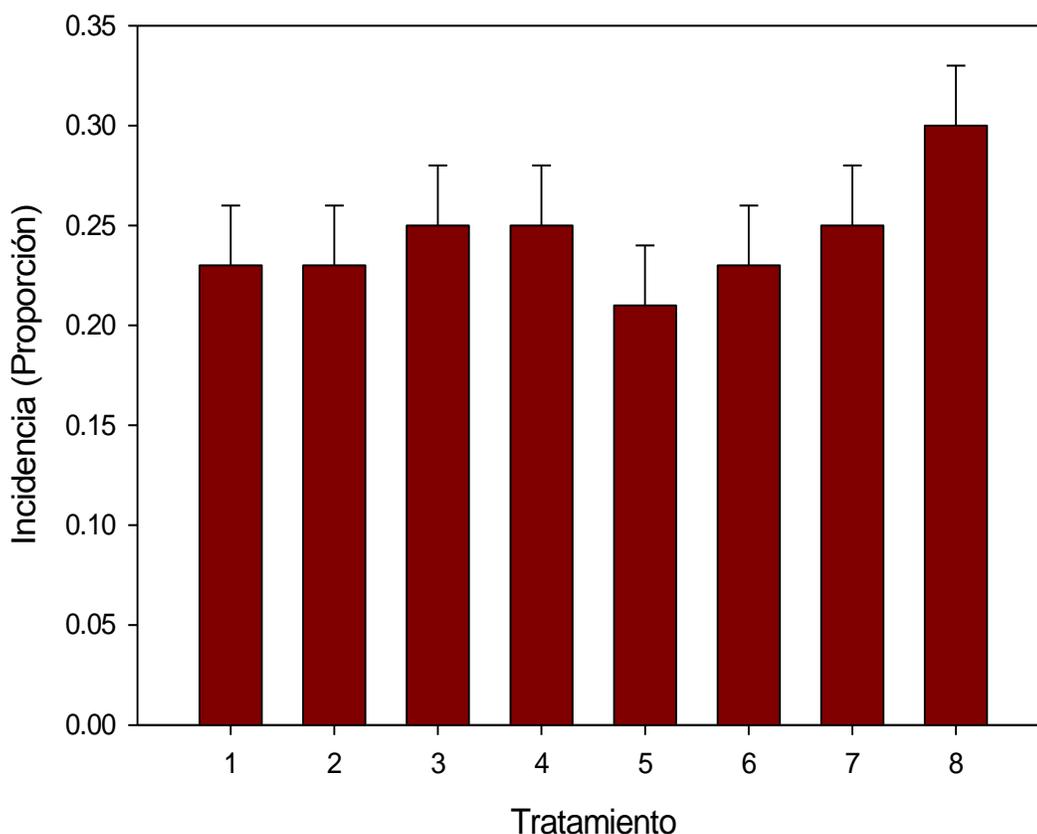


Figura 16. Efecto de programas de aplicación de Fosfito de potasio (48.6% de ácido fosforoso) a una dosis de 3.5 L ha^{-1} sobre la Incidencia del secamiento de la zarzamora. Tratamiento 1: 3 aplicaciones iniciando el 31/07/2010. Tratamiento 2: 3 aplicaciones iniciando el 31/07/2010. Tratamiento 3: 4 aplicaciones iniciando 31/07/2010. Tratamiento 4: 7 aplicaciones iniciando el 31/07/2010. Tratamiento 5: 4 aplicaciones iniciando el 08/09/2010. Tratamiento 6: 2 aplicaciones iniciando el 08/09/2010. Tratamiento 7: 3 aplicaciones iniciando el 05/10/2010. Tratamiento 8: Testigo. Todos los tratamientos fueron aplicados en la misma dosis.

7.5 Detección de *P. sparsa* en el experimento con fosfito de potasio.

Las pruebas previas a la aplicación de los tratamientos confirmaron la presencia del oomycete *P. sparsa* en la parcela experimental con el fosfito de potasio en muestras de hojas asintomáticas antes de hacer las aplicaciones en las 40 unidades experimentales (Figura 8).

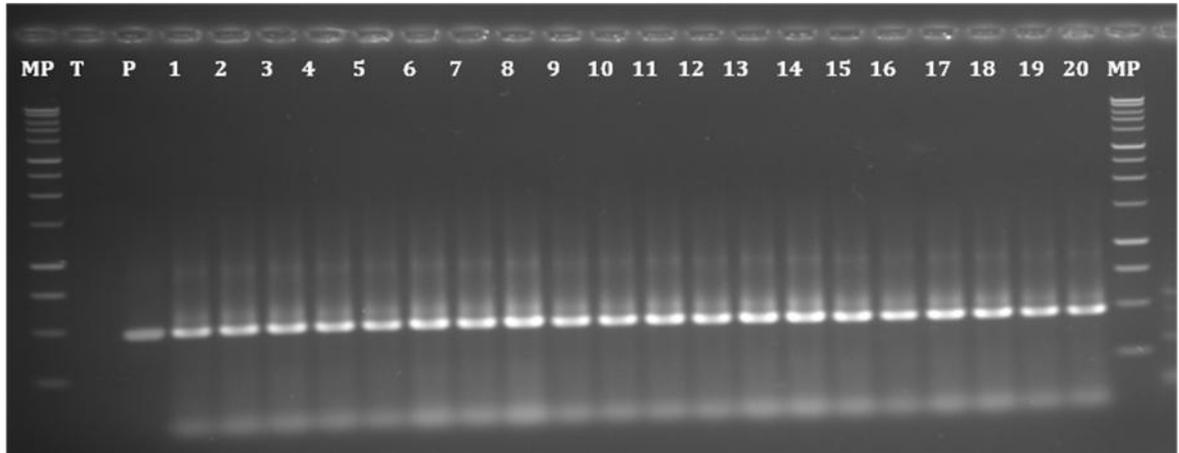


Figura 17. MP=Marcador de peso de 1Kb. PCR anidado con los primers PR3/PR4 en dilución 1/80, siguiendo las condiciones de Aegerter y colaboradores. T= testigo negativo. P= testigo positivo (muestras secuenciada de *P. sparsa*). Carriles 1-20 PCR de las primeras 20 muestras (Hojas asintomáticas) del experimento de la parcela comercial en el Municipio de Ziracuaretiro, Michoacán, antes de la aplicación con Fosfito de potasio.

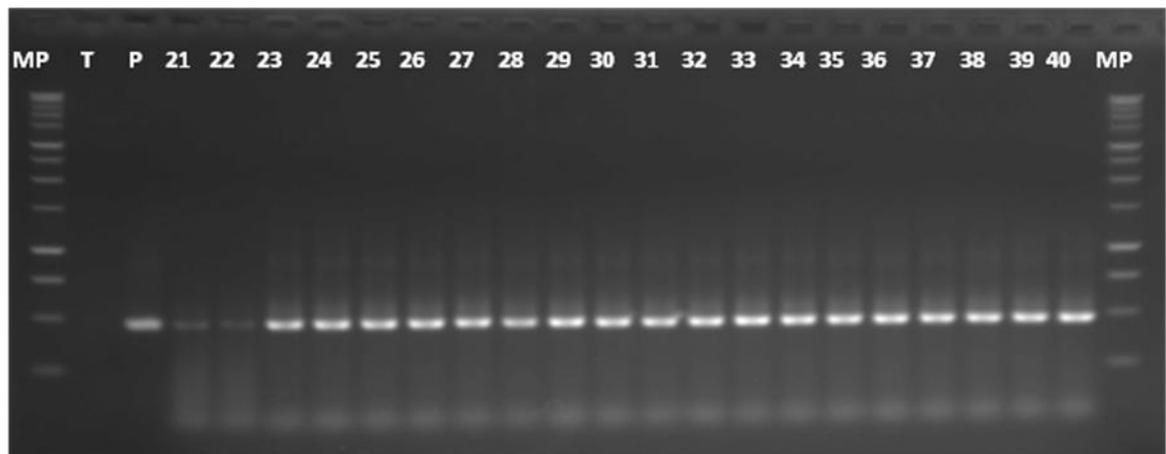


Figura 18. MP=Marcador de peso de 1Kb. PCR anidado con los primers PR3/PR4 en dilución 1/80, siguiendo todas las condiciones de Aegerter y colaboradores. T= testigo negativo. P= testigo positivo (muestras secuenciada de *P. sparsa*). Carriles 21-40 PCR de las siguientes 20 muestras (Hojas asintomáticas) del experimento de la parcela comercial en el Municipio de Ziracuaretiro, Michoacán, antes de la aplicación con Fosfito de potasio.

De la misma manera el oomycete fue detectado también a la mitad del experimento, en 20 unidades experimentales totales, con fecha de colecta del 27 de septiembre del 2010 (Figura 19).

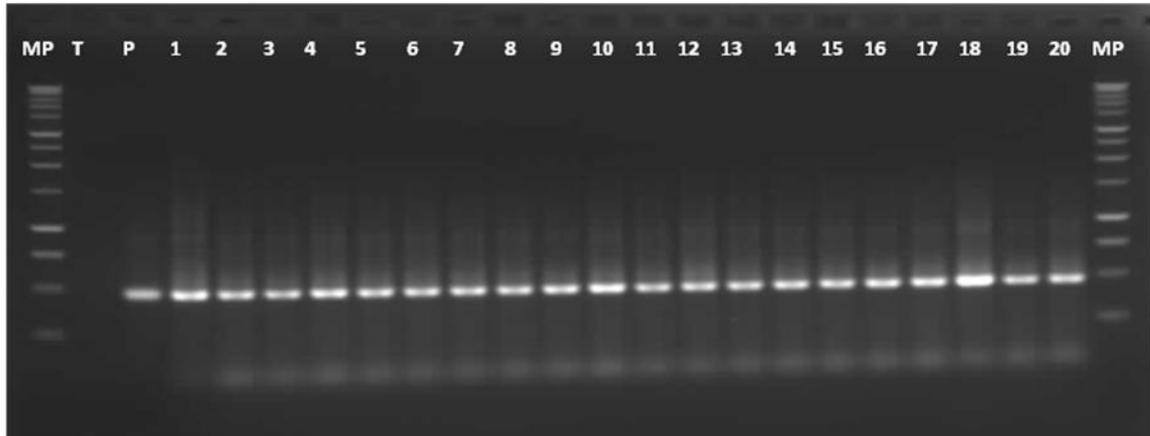


Figura 19. MP=Marcador de peso de 1Kb. PCR anidado con los primers PR3/PR4 en dilución 1/80, siguiendo todas las condiciones de Aegerter y colaboradores. T= testigo negativo. P= testigo positivo (muestras secuenciada de *P. sparsa*). Carriles 1-20 PCR de hojas asintomáticas del experimento de la parcela comercial en el Municipio de Ziracuaretiro, Michoacán, en una etapa intermedia a las aplicaciones con Fosfito de potasio.

Al final de las aplicaciones con Fosfito de potasio (4 de noviembre de 2010), se analizaron frutos sintomáticos de las 40 unidades experimentales evaluadas, obteniéndose todos los resultados positivos en la detección (Figura 20 y 21).

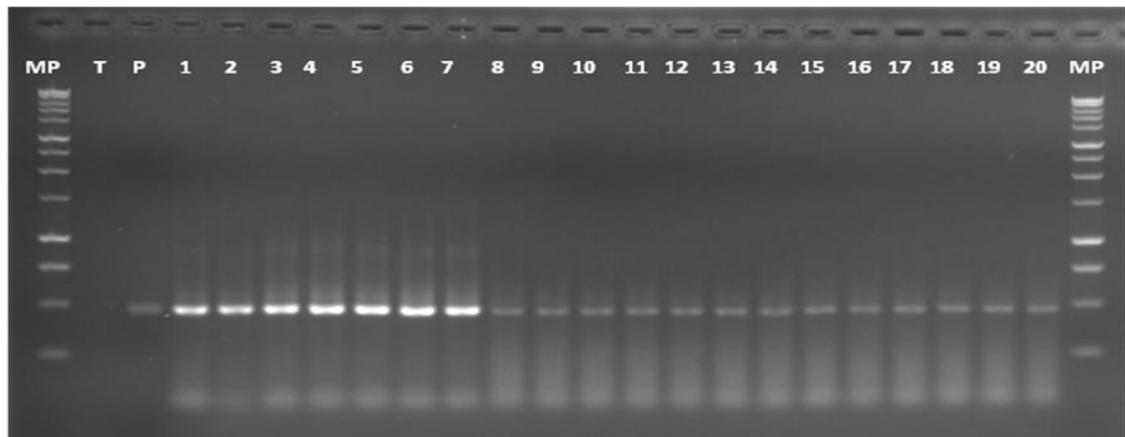


Figura 20. MP=Marcador de peso de 1Kb. PCR anidado con los primers PR3/PR4 en dilución 1/80, siguiendo las condiciones de Aegerter y colaboradores. T= testigo negativo. P= testigo positivo (muestras secuenciada de *P. sparsa*). Carriles 1-20 PCR de frutos sintomáticos del experimento de la parcela comercial en el Municipio de Ziracuaretiro, Michoacán, al final de las aplicaciones con Fosfito de potasio.

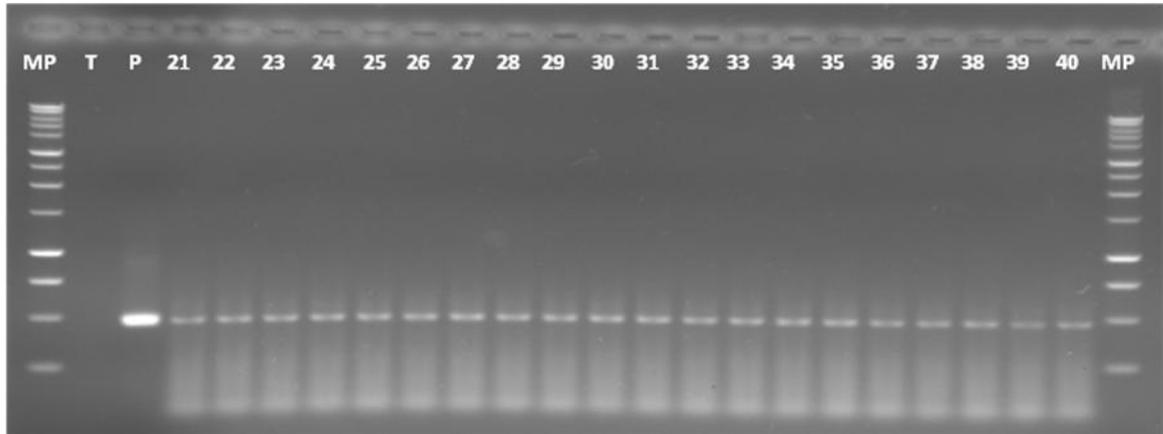


Figura 21. MP=Marcador de peso de 1Kb. PCR anidado con los primers PR3/PR4 en dilución 1/80, siguiendo todas las condiciones de Aegerter y colaboradores. T= testigo negativo. P= testigo positivo (muestras secuenciada de *P. sparsa*). Carriles 21-40 PCR de frutos sintomáticos del experimento de la parcela comercial en el Municipio de Ziracuaretiro, Michoacán, al final de las aplicaciones con Fosfito de potasio.

VIII. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo confirmaron que la metodología utilizada por (Rebollar-Alviter *et al.*, 2009), es una técnica que ofrece alta eficiencia en la detección del oomycete *P. sparsa*, sin embargo a mayores diluciones del primer producto de reacción se observa aún mejor calidad en los resultados.

La técnica de PCR anidado confirmó que las plantas en todos los sitios muestreados estuvieron infectadas con *P. sparsa*, y que tanto hojas y frutos sintomáticos y asintomáticos fueron positivos para este patógeno.

Los estudios realizados por Lindqvist *et al.* (1998), Aegerter *et al.* (2002) fueron útiles para la detección de *P. sparsa* en zarzamora ártica. A diferencia de los autores citados, en esta investigación se utilizaron los 2 pares de primers elaborados por los autores antes mencionados (Lindqvist *et al.*, 1998 y Aegerter *et al.*, 2002) para adaptarlos a un PCR anidado y así detectar al oomycete (Rebollar-Alviter *et al.*, 2009). El par de primers (PR3/PR4) fue utilizado por



Linqvist *et al.* (1998) para la detección del mismo patógeno en *Rubus articus*, cultivadas en Finlandia y los primers PS3/PS4 fueron utilizados por Aegerter *et al.* (2002) para la detección de *P. sparsa* en tejidos de Rosa.

En este trabajo se utilizaron ambos pares de primers, comenzando por la amplificación de la región de mayor tamaño de fragmento; PS3/PS1 (660 pb) seguidas de una región de menor tamaño de fragmento; PR3/PR4 (477 pb) mejorando la detección del patógeno en el cultivo de zarzamora específicamente. Intentos previos con los primers usados en forma independiente no habían dado resultados satisfactorios en el cultivo de zarzamora.

Para fines de manejo la detección oportuna del patógeno *P. sparsa*, sobre todo en hojas y frutos asintomáticos al comienzo de la temporada, así como en malezas existentes en el cultivo, plantas de rosal y otras zarzamoras silvestres, tiene una gran importancia, debido a que no siempre se hacen evidentes los síntomas del mildiú y secamiento del *berry*, sino hasta después de que la plantación ya está en etapa productiva, a veces es demasiado tarde, ocasionando pérdidas hasta del 100% del producto (Rebollar-Alviter *et al.*, 2008).

La detección del oomycete ha sido un éxito en diferentes plantas de rosal comercial utilizando solo un par de primers (PS3/PS1) (Ayala-Vásquez *et al.*, 2008). No obstante en este estudio en el PCR anidado adaptado se logró la detección clara y eficiente del mismo patógeno en plantas de rosal, incluso en una arvense de la familia Fabaceae no reportada anteriormente con la presencia del patógeno (datos no incluidos).

Por otro lado al detectarse el oomycete de manera oportuna y eficaz se podría establecer un programa de manejo de la enfermedad con mayor éxito.

El patógeno se desarrolla mejor en un ambiente de alta humedad y bajas temperaturas, condiciones que se cumplen en la época de lluvias que además coincide con la fenología de la planta; floración y desarrollo del fruto, quizá sea



por eso que en la Figura 16, se observan los tratamientos 3, 4 y 7 con la incidencia más alta a comparación del resto de los tratamientos, incluso en el caso del tratamiento 4, que a pesar de ser el que tiene más aplicaciones con Fosfito de potasio (siete aplicaciones), se encuentra dentro de los tratamientos con mayor incidencia de la enfermedad.

El fosfito de potasio (Supa Active ®) se mueve por el simplasto y apoplasto de las plantas, actuando de esta manera como un fungicida de acción sistémica, y se tiene reportada su excelente actividad contra el grupo de los oomycetes y otros hongos, (Rebollar- Alviter *et al.*, 2007).

Sin embargo, no hubo diferencia estadística significativa entre los tratamientos con respecto al testigo, ($P=0.28$) en la incidencia del secamiento del *berry*, aun cuando se realizaron las aplicaciones con fosfito de potasio después de la defoliación de la planta.

El oomycete fue detectado a lo largo de todo el ciclo del cultivo y no hubo una disminución significativa en la incidencia de la enfermedad.



IX. CONCLUSIONES

La metodología empleada de PCR anidado permitió la detección del oomycete en cualquiera de las etapas vegetativas del cultivo de zarzamora, además de detectarlo en plantas con y sin presencia de síntomas.

El uso de los primers PR3/PR4 y PS3/PS1 usados en PCR anidado fue altamente eficiente para detectar *P. sparsa* en zarzamora (*Rubus* sp. var. Tupy y var. Brazos) en tejido asintomático, sintomático y frutos en Michoacán.

El oomycete *P. sparsa* fue detectado en zonas de gran impacto de producción de zarzamora en Michoacán, tanto en zarzamoras cultivadas (viveros), y silvestres (*Rubus adenotrichus*).

La detección temprana de *P. sparsa* en parcelas comerciales de zarzamora a través de PCR anidada, contribuye de manera significativa al establecimiento de programas de manejo integrado de la enfermedad.

El Fosfite de potasio, podría ser una opción en el manejo de la enfermedad, siempre y cuando se realicen más investigaciones acerca de la variabilidad poblacional de *P. sparsa* además de evaluar la resistencia del mismo a productos. Sin embargo es necesario repetir los experimentos al menos una vez más a fin de corroborar los resultados obtenidos o ajustar los tratamientos y dosis para optimizar las aplicaciones en función de las diferentes etapas fenológicas.



X. LITERATURA CITADA.

- Aegerter, B. J. 2001. Epidemiology and control of rose downy mildew in a bare-root production system. PhD Thesis. University of California, Davis, California, USA.
- Aegerter, B. J., Gordon, T. R., and Davis, R. M. 2000. Occurrence and pathogenicity of fungi associated with melon root rot and vine decline in California. *Plant Dis.* 84:224-230.
- Aegerter, B. J., Nunez, J. J., and Davis, R. M. 2003. Environmental factors affecting rose downy mildew and development of a forecasting model for a nursery production system. *Plant Dis.* 87:732-738.
- Aegerter, B. J., Núñez, J. J., and Davis, R. M. 2002. Detection and management of downy mildew in rose Rootstock. *Plant Dis.* 86:1363-1368.
- Agrios, G. N. 2005. *Fitopatología*. 6ta. Reimpresión. Editorial LIMUSA. Noriega Editores. México, D.F. p.422
- Antonelli, A. L., Tanigoshi, L., Miller, T., and Daniels, C. 2008. Pest Management guide focommercial small fruit. Washington State University Extension. USA 68 p.
- ARS, USDA. 14 December 2004. Invasive Fungi. *Peronospora radii* — Downy mildew of marguerite daisy. Retrieved April 8, 2011, from <http://nt.ars-grin.gov/sbmlweb/fungi/index.cfm>.
- Baker, K. F. 1953. Recent epidemics of downy mildew of rose. *Plant Dis.Reporter* 37:331-339.
- Barker, J. 1946. Sterfte in den jongen Eozenaanplant, voorjaar 1946. [Mortality in young rose plantings in the spring of 1946.] *Meded Direct Tuinb.*
- Berkeley, M. J. 1862. *Peronospora sparsa*. *Gardeners' Chronicle*, London, 307-308.
- Breese, W. A., Shattock, R. C., Williamson, B., and Hackett, C. 1994. *In vitro* spore germination and infection of cultivars of *Rubus* and *Rosa* by downy mildews from both hosts. *A.Ap.Biol.* 125:73-85.
- Calderón, Z. G. 2009. Situación y manejo del cultivo de zarzamora en producción forzada. En: *Manejo integral de zarzamora*. II Curso de Capacitación en Ziracuaretiro. Michoacán, México. pp. 2-26.



- Cano, M. R. y Rodríguez, A. J. 1989. Caracterización del fruto de cinco cultivares de zarzamora erecta (*Rubus* sp.). Memoria. SOMECH. III. Congreso Nacional. 32 p.
- CEXPORITA, 2004. Centro Empresarial para las Exportaciones de Michoacán. www.cexporita.com/mx_i/materiales/ZARZAMORA.pdf. Consultado en febrero de 2011.
- Chávez, F. S. 1999. Manejo postcosecha y procesamiento de la frambuesa y zarzamora. Primera reunión nacional sobre frutales nativos e introducidos, producción en Michoacán de frutas exóticas con demanda nacional e internacional, Uruapan, Mich. México. 98 p.
- CIMMYT. 2006. Protocolos de laboratorio: Laboratorio de Genética Molecular Aplicada del CIMMYT. Tercera edición. México, D.F.: CIMMYT.
- Cooke, D. E. L., Williams, N. A., Williamson, B., and Duncan, J. M. 2002. An ITS-based phylogenetic analysis of the relationships between *Peronospora* and *Phytophthora*. In: Spencer-Phillips PTN, Gisi U, Lebeda A, eds. Advances in Downy Mildew Research. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 161-165.
- Crepel, C., and Inghelbrecht, S. 2002. First record of leaf spots on *Prunus laurocerasus* in Belgium caused by *Phytophthora cactorum* and *Peronospora sparsa*. Plant Disease 86:563.
- Cuboni, G. 1888. Le Stazioni Sperimentali Agrari Italiane, Roma, 14:295-308.
- Daniel, R., and Guest, D. 2006. Defence responses induced by potassium phosphonate in *Phytophthora palmi* ora-challenged *Arabidopsis thaliana*. Physiol. Mol. Plant Pathol. 67:194–201.
- Daughtrey, M., and Tobiasz, M. 2001. Control of downy mildews on miniature rose and snapdragon. Phytopathology 91:S194.
- Dickerson, W. G. 2005. Blackberry Production in New Mexico. Guide H-325. College of Agriculture, Consumer and Environmental Sciences New Mexico State University. aces.nmsu.edu/pubs/_h/h-325.html. Consultado en 29 de marzo de 2011.
- Doyle, J. J., and Doyle, J. L. 1990. A rapid total ADN preparation procedure for fresh plant tissue. Focus 12:13-15.
- Dobrowolski, M. P., Shearer, B. L., Coluhoun I.J., O'Brien. P. A. and Hardy, G. E. St.J. 2008. Selection for decreased sensitivity to phosphitr in



- Phytophthora cinnamomi with prolonged use of fungicide. Plant Path. 57:928-936
- Ellis, M. A. Converse, R.H. Williams, R.N. and Williamson, B. 1991. Compendium of Raspberry and Blackberry Diseases and Insects. American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota. United States of America. 100 p.
- Elmhirst, J. F., Jurkemik, P., and Hudgins, E. J. 2002. Management of rose downy mildew (*Peronospora sparsa*) in British Columbia nurseries. Canadian Journal of Plant Pathology 24:86-91.
- EPPO. 2009. PQR database. Paris, France: European and Mediterranean Plant Protection Organization. www.eppo.org.
- Fahmy, T. 1927. Egypt: additional list of diseases of economic plants (1924-1925). International Review of Agriculture 18:611.
- Ferrucho, R. L. 2006. Diagnóstico molecular y variabilidad genética de *Peronospora sparsa* Berkeley en cultivos de rosa (*Rosa* sp.) bajo invernadero. Posgrado en Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía. Santa Fé de Bogotá. 89 p.
- Fungicide Resistance Action Committee, 2005.
<http://www.frac.info/frac/index.htm>.
- Gluber, W. D. 1991. Downy mildew. pp. 15-16. In: Compendium of raspberry and blackberry diseases and insects. Ellis, A. M. (ed). APS Press. Minnesota, USA.
- Hagan, A. K., Olive, J. W., Stephenson, J., and Rivas-Davila, M. E. 2000. Chemical control of downy mildew on rose. SNA Research Conference 45:214-217.
- Hall, G., Cook, R. T. A., and Bradshaw, N. J. 1992. First record of *Peronospora sparsa* on *Prunus laurocerasus*. Plant Pathology 41:224-227.
- Hall, H. K., and Shaw, C. G. 1982. Oospores of *Peronospora sparsa* Berk. on *Rubus* species. New Zealand Journal of Experimental Agriculture 10:429-432.
- Hall, H. K., and Shaw, C. G. 1987. Brambles: downy mildew on wild and cultivated *Rubus* species in New Zealand. New Zealand Journal of Experimental Agriculture 15:57-60.



- Hendrick, U. P. 1925. The small fruits of New York. J.B. Lyon, Albany, N.Y.
- Hellqvist, S., Koponen, H., Lindqvist, H., and Valkonen, J. 1998. The downy mildew fungus *Peronospora sparsa* in wild arctic bramble and in cultivated hybrid arctic bramble-sampling in northern Sweden. 62:41-45.
- Horst, R. K. 1991. Compendium of Diseases. American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota. USA. 630 p.
- Hukkanen, A., Pietikäinen, L., Kärenlampi, S., and Kokko, H. 2006. Quantification of downy mildew (*Peronospora sparsa*) in *Rubus* species using real-time PCR. European Journal of Plant Pathology 116:225-235.
- Jamie, T. D., Geoff, R. A., and Margeret, A. W. 2001. Dispersal of *Acalitus essigi* to blackberry (*Rubus fruticosus* L.) fruit. Entomologia Experimentalis et Applicata 101:19-23.
- Jennings, D. L. 1988. Raspberries and Blackberries: Their breeding, diseases and growth. Academic Press, San Diego, California. 84 p.
- Jiménez, G. L. 1994. Fertilización foliar con urea a cuatro cultivares de zarzamora (*Rubus* sp.) en Chapingo, México. Tesis Profesional. Departamento de Fitotecnia. UACH. Chapingo, México. 72 p.
- Johns, T. H. 1972. Report of the Department of Agriculture New South Wales for the year ended 30 June, 1971. New South Wales, Australia: New South Wales Department of Agriculture.
- Kokko, H., Virtaharju, O., KSrenlampi, S., Cooke, D. E. L., Williams, N. A., and Williamson, B. 1999. Downy mildew (*Peronospora rubi*) in *Rubus arcticus*: a threat to commercial berry production in Finland. Acta Horticulturae 505:137-141.
- Lindqvist, H., Kaponen, H., and Valkonen, J. 1988. *Peronospora sparsa* on Cultivated *Rubus arcticus* its detection by PCR based on ITS sequences. Plant Disease 82:1304-1311.
- Lindqvist, H., Kaponen, H., and Valkones, J. 2002. Variability of *Peronospora sparsa* (syn. *P. rubi*) in Finland as measured by amplified fragment length polymorphism. European Journal of Plant Pathology 108: 327-335.
- López, M. L. 2006. Variedades de especies de frutos pequeños apropiadas para climas subtropicales: la experiencia de México. III Simposio nacional do morango, II Encontro sobre pequenas frutas e frutas nativas do Mercosul-Palestras. pp. 87-90.



- Mendoza-Zamora, C. 1993. Enfermedades del rosal en México. Dirección de Patronato Universitario. UACH. México. 62 p.
- Moore, J. N., and Shirvin, R. M. 1990. Blackberry Management. In. Galleta G. I. and D. G. Himelrirk (Eds). Small Fruist Crop Management. Prentice Hall, Englewood Cliffs N. J. 255-272 pp.
- Moore, J. N., and Skirvin, R. M. 1990. Blackberry management In: Small Fruit Crop Management. Prentice Hall. Englewood, New Jersey.
- Moore, J. N. 1994. Mejoramiento genético, manejo y perspectiva de la zarzamora en América del Norte. Memorias de la 1ª Reunión Internacional y 2ª Reunión Nacional de Frutales Nativas e Introducidos. Montecillo, México. 167-178 pp.
- Moore, J. N., Brown, E., and Sistrunk, W. A. 1974. "Comanche" blackberry. HortScience 9:245-256.
- Moore, J. N., Brown, E., and Sistrunk, W. A. 1977. "Cheyenne" Blackberry. Hortscience. 12:77-78.
- Muñoz, R. M. y Juárez, M. 1997. El mercado mundial de la frambuesa y la zarzamora. ASERCA-CIESTAAM-UACH. México. 91 p.
- Muratalla, L. A. 1993. Manejo de variedades de zarzamora, tipo erecto. Producción en Michoacán de frutos exóticos con demanda nacional e internacional. Uruapan, Michoacán, Méx. 98 p.
- Muratalla, L. A. 1994. El cultivo de la zarzamora. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. Pp 181.
- Muratalla, L. A. 1995. Situación actual de la zarzamora en México. Documento preparado por el Consejo Consultivo Fitosanitario. SAGARH. México.
- Muñoz, R. M. y Juárez, M. 1995. El mercado mundial de la frambuesa y la zarzamora. ASERCA-CIESTAAM-UACH. México. 91 p.
- Nelson, M. E., Eastwell, K.C., Grove, G.G., Barbour, J. D., Ocamb, M., and Alldredge, J.R. 2004. Sensitivity of Pseudoperonospor humuli (the causal agent of hop downy mildew) from Oregon, Idaho, and Washington to Fosetyl-Al (Alliette). Plant Health Progress doi: 10.1094/PHP-2004-0811-01 RS.
- Ochoa, F. L. E. 2002. La zarzamora ante los retos de la globalización y el desarrollo local: El caso del municipio de Ziracuáretiro, Michoacán,



- México. Tesis de Maestría en Ciencias, Universidad Autónoma Chapingo, Morelia, Mich., México. 194 p.
- Ogawa, M. J., Zehr, E. I., and Bird, G. W. 1995. Compendium of Stone Fruits Diseases. APS Press. St. Paul, Minnesota. USA. 98 p.
- O'Neill, T. M., Pye, D., and Locke, T 2002. The effect of fungicides, irrigation and plant density on the development of *Peronospora sparsa*, the cause of downy mildew in rose and blackberry. *Annals of Applied Biology* 140:207-214.
- Orlando-Montilla, J., Delgado, B., and Jimenez-Perez, N. 2003. Causal agents and the intensity of fungal diseases of blackberry in Lara State. *Fitopatología Venezolana* 16:31-34.
- Pacheco, S. P. 1975. Cultivo de frambuesas y zarzamoras. Comisión Nacional de fruticultura (CONAFRUT). Serie de divulgación. SAGARH. México. pp 1-18.
- Pickel, B. 1939. O mildio da Roseira em S. Paulo. [Rose downy mildew in S. Paulo.] *Biologico* 5:192-194.
- Plunkett, O. A. 1928. The occurrence of *Peronospora sparsa* Berk. on hot-house roses in southern California. *Phytopathology* 18:950.
- Poiling, E. B. 1996. Blackberry production in North Carolina. Portal en internet: <http://www.Ces.ncsu.edu/hil/hil-200-b.html>. Fecha de consulta: 07 de Enero del 2010.
- Pritts, M., and Handley, D. 1989. Bramble Production Guide. North east Regional Agricultural Engineering Service, Ithaca, NY. 189 pp. In Ellis M. A., Converse R.H., Williams R.N.
- Quiroga, N. J., y Arbeláez, T. G. 2004. Evaluación de la eficacia de fungicidas aplicados al suelo y al follaje para el control de mildiú veloso, ocasionado por *Peronospora sparsa* en un cultivo comercial de rosa. *Agronomía Colombiana* 22:110-118.
- Ramachandran, N., Purushothaman, V., and Purushothaman, S. M. 2003. *Peronospora sparsa* - a new disease on field grown roses. *Indian Phytopathology* 56:236.
- Rebollar-Alviter, A. y Pineda, G. S. 2009. Principales Plagas y Enfermedades de la zarzamora. In: II Curso de Manejo Integral de Zarzamora. Ziracuaretiro, Michoacán, México. pp 58-80.



- Rebollar-Alviter, A. 2001. Enfermedades y plagas de mayor importancia en los cultivos de zarzamora y frambuesa (*Rubus* spp.) en México. XXVII Simposio Nacional de Parasitología Agrícola, Uruapan, Michoacán, México. 201-205 pp.
- Rebollar-Alviter, A., Silva-Rojas, H. V., and Zelaya-Molina, L. X. 2008. Shoot blight and anthracnose in Blackberry in Mexico is caused by *Glomerella cingulata*. *Phytopathology* 98:S131.
- Rebollar-Alviter, A., Silva-Rojas, H. V., Zelaya-Molina, L. X., and Ellis, M. A. 2009. First report of *Peronospora sparsa* causing downy mildew (Dryberry) of *Rubus fruticosus* in Mexico. *Plant disease* 93:674.
- República de China-OIRSA. Buenas Prácticas Agrícolas en Mora Orgánica. Guatemala 2003. Proyecto Regional de Fortalecimiento Vigilancia Fitosanitaria en Cultivos de Exportación no Tradicionales. www.ceaecuador.org/imagesFTP/4718.Manual_mora_organica_VIFINEX. Consultado en febrero de 2010.
- Ryugo, K. 1993. Fruticultura, ciencia y arte. Jorge Rodríguez Editor. México. P.p 14-39.
- Rzedowski, G. C. y de Rozedowski, J. 2001. Flora fanerogámica del Valle de México. 2ª. Ed., Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro, Michoacán, 1406 p.
- Rzedowski, J. y de Rzedowski, G. C. 2005. Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes. Fascículo 135. Familia Rosaceae. Instituto de Ecología A. C. Centro Regional del Bajío Pátzcuaro, Michoacán, México. 157 p.
- Sánchez, R. G. 2008. La Red de Valor de la zarzamora. El cluster de Los Reyes, Michoacán un Ejemplo de Reconversión Competitiva. Primera edición. Fundación PRODUCE Michoacán, A.C. Morelia, Michoacán, México. 116 p.
- Semanario Guía. 2008. Semanario Regional Independiente. El Secretario de Agricultura inauguró el Congreso de Berries. semanarioguia.com/bloge/////index.php?blog=2&title=title_4&more=1&c=1&t b=1&pb=1. Consultado en abril de 2010.
- SIAP-SAGARPA, 2010. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Cierre de la Producción Agrícola por cultivo 2008/Zarzamora/Estado de Michoacán/Municipio/Modalidad Riego + Temporal. Portal en internet: www.siap.gob.mx. Fecha de consulta: 01-Junio-2010.



- Strik, B., Finn, C., Clark, J. R., and Pilar, M. B. 2006. Worldwide Blackberries Production. Proceeding of International Society for Horticultural Science. Rubus symposium (Proceedings). Chile.
- Strik, B. C., Clark, J. R., Finn, C. E., and Bañados, M. P. 2007. Comprehensive crop reports. Worldwide Blackberry Production. J. Hortotechnology 17:205-213.
- Strik, B. C. 1996. Blackberry cultivars and production in the Pacific Northwest. Fruit. Var.J. 46:202-206.
- Tate, K. G. 1981. Aetiology of dryberry disease of boysenberry in New Zealand. New Zealand Journal of Experimental Agriculture 9:371-376.
- Tate, K. G., and van der Mespel, G. J. 1983. Control of dryberry disease (*Peronospora sparsa*) in boysenberry with fungicides. New Zealand Journal of Experimental Agriculture 11:141-146.
- Tian, X., Lu, G., and Bai, J. 1998. A new record of *Peronospora* in China. Mycosystema 17:287-288.
- Valdespino, J. J. 1995. Comercialización de la zarzamora in Primera reunión regional sobre recursos genéticos potenciales, tecnologías alternativas y mercados para la agricultura de la región centro Occidente de México. Morelia, Mich.
- Williamson, B. 1991. Compendium of Raspberry and Blackberry Diseases and Insects. The American Phytopathological Society Press. United States of America. 100 pp.
- Williamson, B. 1991b. Spurr blight. In Compendium of blackberry and raspberry diseases and insects. M.A. Ellis (ed). APS. Press. Minnesota, USA. p 5-7.
- Xu, X-M., and Pettitt, T. 2004. Overwintering of rose downy mildew (*Peronospora sparsa*). In: Spencer-Phillips P, Jeger M, eds. Advances in Downy Mildew Research, Vol. 2. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 99-106.



ANEXOS

(1) SECUENCIAS UTILIZADAS EN LA ELABORACIÓN DEL ÁRBOL FILOGENÉTICO:

>AF266783.Peronospora.sparsa.IMI344695

CCACACCTAAAAACTTTCCACGTGAACCGTATCAACCAACATAATTGGGG
GTTTATTTGGCGGCGGCTGCTGGCATTTTGTGCTGGCTGGCTGCTACTGG
GCAAGCCCTATCGCGAGCGTTTGGGCCTTGGCCTGAGCTAGTAGCTTTTAT
TTTAAACCATTCTTAATTACTGATTATACTGTGGGGACGAAAGTCTCTGCTT
TTAACTAGATAGCAACTTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATG
AAGAACGCGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGT
CATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTCCGGGTTAGTCCTGGAAGTATG
CCTGTATCAGTGTCCGTACATCAAACCTTGGTTTTCTTCTTTCCGTGTAGTCG
GTGGAGGATATGCCAGATGTGAAGTGTCTTGCGGCTGATTTTCGGATCGG
CTGCGAGTCCTTTGAAATGTACAGAACTGTACTTCTCTTTGCTCGAAAAGCA
TGCGTGTGCTGATTGTGGAGGCTGTCCGCGTGGCCAGTCGGCGATCGGTT
TGTCTGCTGTGGCTTAATGGAGGAGTGTGGATTTCGCGGTATGATTGGCTT
CGGCTGAACAGGCGCTTATTGGACGTTCTTTCTGCTATGGCGGTATGGACT
GATGAACCGTAGCTATGCGTTGACTTGGCTTTTGAATTGGCTTTGCTGTTG
CGAAGTAGAGTGGCAGTTTCAGCTGTGCGAGGGTCGACCCATATTGGGAAA
TTGTGCTGTGCGGCTTCGGTTCGTGTGGCATCTCAA

>DQ887773.Peronospora.sparsa

GCTTTTATTTTAAACCATTCTTAATTACTGATTATACTGTGGGGACGAAAGTC
TCTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCAC
ATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTC
AGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTCCGGGTTAGTCCTGG
AAGTAGCCTGTATCAGTGTCCGTACATCAAACCTTGGTTTTCTTCTTTCCGTG
TAGTCGTGGAGGATATGCCAGATGTGAAGTGTCTTGCGGCTGATTTTCGGA
TCGGCTGCGAGTCCTTTGAAATGTACAGAACTGTACTTCTCTTTGCTCGAAA
AGCATGGCGTTGCTGATT

>DQ874346.Peronospora.sparsa.voucher.SMK19228

CCACACCTAAAAACTTTCCACGTGAACCGTATCAACCAACATAATTGGGG
GTTGTTTNGCGGTGGCTGCTGGCATTTTGTGCTGGCTGGCTGCTACTGGG
CAAGCCCTATCGCGAGCGTTTGGGCCTTGGCCTGAGCTAGTAGCTTTTATT
TAAACCATTCTTAATTACTGATTATACTGTGGGGACGAAAGTCTCTGCTTTT
AACTAGATAGCAACTTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAA
GAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCA
TCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTCCGGGTTAGTCCTGGAAGTATGCC
TGTATCAGTGTCCGTACATCAAACCTTGGTTTTCTTCTTTCCGTGTAGTCGGT
GGAGGATATGCCAGATGTGAAGTGTCTTGCGGCTGATTTTCGGATCGGCT



GCGAGTCCTTTGAAATGTACAGA ACTGTACTTCTCTTTGCTCGAAAAGCGT
GGCGTTGCTGATTGTGGAGGCTGTCCGCGTGGCCAGTCGGCGATCGGCTT
GTCTGCTGTGGCTTAATGGAGGAGTGTGGATTTCGCGGTATGATTGGCTTC
GGCTGAACAGGCGCTTATTGGACGTTCTTTCTGCTATGGCGGTATGGACTG
ATGAACCGTAGCTATGCGTTGACTTGGCTTTTGAATTGGCTTTGCTGTTGC
GAAGTAGAGTGGCAGTTTCGGCTGTCGAGGGTTCGACCCATTTGGGAAATT
GTGCTGTGCGGCTTCGGTCGTGTGGCATCTCAA

>DQ874345.Peronospora.sparsa.voucher.SMK18380

CCACACCTAAAAACTTTCCACGTGAACCGTATCANCNACATAATTGGGGG
TTTGTGGCGGTGGCTGCTGGCATTGTGCTGGCTGGCTGCTACTGGG
CAAGCCCTATCGCGAGCGTTTGGGCCTTGGCCTGAGCTAGTAGCTTTTATT
TAAACCATTCTTAATTACTGATTATACTGTGGGGACGAAAGTCTCTGCTTTT
AACTAGATAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAA
GAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCA
TCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTCCGGGTTAGTCCTGGAAGTATGCC
TGTATCAGTGTCCGTACATCAA ACTTGGTTTTCTTCTTTCCGTGTAGTCGGT
GGAGGATATGCCAGATGTGAAGTGTCTTGC GGCTGATTTTCGGATCGGCT
GCGAGTCCTTTGAAATGTACAGA ACTGTACTTCTCTTTGCTCGAAAAGCGTG
GCGTTGCTGATTGTGGAGGCTGTCCGCGTGGCCAGTCGGCGATCGGTTTG
TCTGCTGTGGCTTAATGGAGGAGTGTGGATTTCGCGGTATGATTGGCTTCG
GCTGAACAGGCGCTTATTGGAGTTCTTTCTGCTATGGCGGTATGGACTGAT
GAACCGTAGCTATGCGTGA CTTGGCTTTTGAATTGGCTTTGCTGTTGCGAA
GTAGAGTGGCAGTTTCGGCTGTCGAGGGTTCGACCCATTTGGGAAATTGTG
CTGTGCGGCTTCGGTCGTGTGGCATCTCAA

>DQ874344.Peronospora.sparsa.voucher.SMK17872

CCACACCTAAAAACTTTTCACGTGAACCCGATCAACCAACATAATTGGGG
GGTTGTTTGGCGGTGGCTGCTGGCATTGTGCTGGCTGGCTGCTACTGG
GCAAGCCCTATCGCGAGCGTTTGGGCCTTGGCCTGAGCTAGTAGCTTTTAT
TTAAACCATTCTTAATTACTGATTATACTGTGGGGACGAAAGTCTCTGCTTT
TAACTAGATAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGA
AGAACGTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCA
TCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTCCGGGTTAGTCCTGGAAGTATGCC
TGTATCAGTGTCCGTACATCAA ACTTGGTTTTCTTCTTTCCGTGTAGTCGGT
GGAGGATATGCCAGATGTGAAGTGTCTTGC GGCTGATTTTCGGATCGGCT
GCGAGTCCTTTGAAATGTACAGA ACTGTACTTCTCTTTGCTCGAAAAGCGT
GGCGTTGCTGATTGTGGAGGCTGTCCGCGTGGCCAGTCGGCGATCGGTTT
GTCTGCTGTGGCTTAATGGAGGAGTGTGGATTTCGCGGTATGATTGGCTTC
GGCTGAACAGGCGCTTATTGGTTCTTTCTGCTATGGCGGTATGGACTGATG
AACCGTAGCTATGCGTGA CTTGGCTTTTGAATTGGCTTTGCTGTTGCGAAG
TAGAGTGGCAGTTTCGGCTGTCGAGGGTTCGACCCATTTGGGAAATTGTGCT
GTGCGGCTTCGGTCGTGTGGCATCTCAA



>DQ874343.Peronospora.sparsa.voucher.SOMF14086

CCACACCTAAAAA ACTTTCCACGTGAACCGTATCAACCAACATAATTGGGG
GTTTGTGGCGGCGGCTGCTGGCATTGTTGTGCTGGCTGGCTGCTACTGG
GCAAGCCCTATCGCGAGCGTTTGGGCCTTGGCCTGAGCTAGTAGCTTTTAT
TTAAACCATTCTTAATTACTGATTATACTGTGGGGACGAAAGTCTCTGCTT
TTAACTAGATAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATG
AAGAACGCGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGT
CATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTCCGGGTTAGTCCTGGAAGTATG
CCTGTATCAGTGTCCGTACATCAA ACTTTGGTTTTCTTCTTTCCGTGTAGTCG
GTGGAGGATATGCCAGATGTGAAGTGTCTTGCGGCTGATTTTCGGATCGG
CTGCGAGTCCTTTGAAATGTACAGAACTGTACTTCTCTTTGCTCGAAAAGC
GTGGCGTTGCTGATTGTGGAGGCTGTCCGCGTGGCCAGTCGGCGATCGG
TTTGTCTGCTGTGGCTTAATGGAGGAGTGTGTTGATTTCGCGGTATGATTGGC
TTCGGCTGAACAGGCGCTTATTGACGTTCTTTCTGCTATGGCGGTATGGAC
TGATGAACCGTAGCTATGCGTTGACTTGGCTTTTGAATTGGCTTTGCTGTTG
CGAAGTAGAGTGGCAGTTTCGGCTGTGCGAGGGTTCGACCCATTTGGGAAAT
TGTGCTGTGCGGCTTCGGTCGTGTGGCATCTCAA

>DQ874342.Peronospora.sparsa.voucher.SOMF15575

CCACACCTAAAAA ACTTTCCACGTGAACCGTATCAACCAACATAATTGGGG
GTTTGTGGCGGCGGCTGCTGGCATTGTTGTGCTGGCTGGCTGCTACTGG
GCAAGCCCTATCGCGAGCGTTTGGGCCTTGGCCTGAGCTAGTAGCTTTTAT
TTAAACCATTCTTAATTACTGATTATACTGTGGGGACGAAAGTCTCTGCTT
TTAACTAGATAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATG
AAGAACGCGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGT
CATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTCCGGGTTAGTCCTGGAAGTATG
CCTGTATCAGTGTCCGTACATCAA ACTTTGGTTTTCTTCTTTCCGTGAGTCGG
TGGAGGATATGCCAGATGTGAAGTGTCTTGCGGCTGATTTTCGGATCGGCT
GCGAGTCCTTTGAAATGTACAAA ACTGTACTTCTCTTTGCTCGAAAAGCGTG
GCGTTGCTGATTGTGGAGGCTGTCCGCGTGGCCAGTCGGCGATCGGTTTG
TCTGCTGTGGCTTAATGGAGGAGTGTGTTGATTTCGCGGTATGATTGGCTTCG
GCTGAACAGGCGCTTATTGGGTTCTTTCTGCTATGGCGGTATGACTGATG
AACCGTAGCTATCGTGACTTGGCTTTTGAATTGGCTTTGCTGTTGCGAAGT
AGAGTGGCAGTTTCGGCTGTGCGAGGGTTCGACCCATTTGGGAAATTGTGCT
GTGCGGCTTCGGTCGTGTGGCATCTCA

>AY035488.Peronospora.sparsa.isolate.MG14-9

TAGTAACGGCGAGTGAAGCGGGATGAGCTCAAGCTTAAATCTCCGTATAA
GTTTTGTACGGCGAATTGTAGTCTATAGAGGCGTGGTCAGTGTGGGCACTT
GGGGTAAGTTCCTTGGAAGAGGACAGCATGGAGGGTGATACTCCCGTTCA
TCCCTAAGTGGCTCGTGCGTACGACCCGTTTTCTTTGAGTCGCGTTGTTG
GGAATGCAGCGCAAAGTAGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGT
GCGAGACCGATAGCATACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGAACTTT



GAAAAGAGAGTTAAAGAGTACCTGAAACTGCTGAAAGGGAACCGAATCGTT
TCCAGTGTCTATAATCCGTGGCATATTTTCATTGGCGAGTGTGTGCGTCGTG
TGCTATGGCAGCGGCTTTTTTGGCTGCGCTTGGCGTGTGTGCTGTGTGTG
CTTGCTGGTGCCCTGCTGCGGTGGGACGTCAATGTCAGTTCGTATGCTGC
GGGAAATGGCTGCCGAGGAGGTAGGGCTTACGCTTGCCTTTGTCTGTTAT
ATCTTGGTGGACGAGTAGTCGCGGTTGGGACTGAGGTGCCTACAACGTGC
TTTTGAGTGGGCTTGTGTCTCGTGTGCGCCGTGTGCGGATAGCTTGCTATG
TGTGTGTGGTTGTGTGTGGATTGATGCGAGCT

>EU601171.Peronospora.sparsa isolate HSSFEA

TACTGGGCAAGCCCTATCGCGAGCGTTTGGGCCTTGGCCTGAGCTAGTAG
CTTTTATTTAAACCATTCTTAATTACTGATTATACTGTGGGGACGAAAGTCT
CTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACA
TCGAGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCA
GTGAGTCATCGAAATTTGAACGCATATTGCACTTCCGGGTTAGTCCTGGA
AGTATGCCTGTATCAGTGTCCGTACATCAAACCTTGGTTTTCTTCTTTCCGTG
TAGTCGGTGGAGGATATGCCAGATGTGAAGTGTCTTGCGGCTGATTTTCGG
ATCGGCTGCGAGTCCTTTGAAATGTACAGAACTGTACTTCTCTTTGCTCGAA
AAGCATGGCGTTGCTGATTGTGGAGGCTGTCCGCGTG

>EU601170.Peronospora.sparsa.isolate.FEHSSA

TGGGCAAGCCCTATCGCGAGCGTTTGGGCCTTGGCCTGAGCTAGTAGCTT
TTATTTTAAACCATTCTTAATTACTGATTATACTGTGGGGACGAAAGTCTCTG
CTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCG
ATGAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGA
GTCATGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTCCGGGTTAGTCCTGGAAGTAT
GCCTGTATCAGTGTCCGTACATCAAACCTTGGTTTTCTTCTTTCCGTGTAGTC
GGTGGAGGATATGCCAGATGTGAAGTGTCTTGCGGCTGATTTTCGGATCG
GCTGCGAGTCCTTTGAAATGTACAGAACTGTACTTCTCTTTGCTCGAAAAG
CATGGCGTTGCTGATTGTGGAGGCTGTCCGC

>EU601169.Peronospora.sparsa.isolate.HCST

CTACTGGGCAAGCCCTATCGCGAGCGTTTGGGCCTTGGCCTGAGCTAGTA
GCTTTTATTTTAAACCATTCTTAATTACTGATTATACTGTGGGGACGAAAGTC
TCCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATC
GATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGT
GAGTCTCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTCCGGGTTAGTCCTGGAAGT
ATGCCTGTATCAGTGTCCGTACATCAAACCTTGGTTTTCTTCTTTCCGTGTAG
TCGGTGGAGGATATGCCAGATGTGAAGTGTCTTGCGGCTGATTTTCGGATCG
GGCTGCGAGTCCTTTGAAATGTACAGAACTGTACTTCTCTTTGCTCGAAA
GCATGGCGTTGCTGATTGTGGAGGCTGTCCGCGTG

>EU601168.Peronospora.sparsa.isolate.HSSA

CTACTGGGCAAGCCCTATCGCGAGCGTTTGGGCCTTGGCCTGAGCTAGTA
GTTTTATTTTAAACCATTCTTAATTACTGATTATACTGTGGGGACGAAAGTCT



CTCTTTAACTAGATAGCAACTTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATC
GATGAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGT
GAGTCATGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTCCGGGTTAGTCCTGGAAGT
ATGCCTGTATCAGTGTCCGTACATCAAACCTGGTTTTCTTCTTTCCGTGTAG
TCGGTGGAGGTATGCCAGATGTGAAGTGTCTTGCGGCTGATTTTCGGATC
GGCTGCGAGTCCTTGAAATGTACAGAACTGTACTTCTCTTTGCTCGAAAAG
CATGGCGTTGCTGATGTGGAGGCTGTCCGCGTG

>EU391654.Peronospora.sparsa.isolate.TS2-1

TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCACACCTAAAAACTTTCCA
CGTGAACCGTATCAACCAACATAATTGGGGGTTTATTTGGCGGGCGGCTGCT
GGTTTTGTGCTGGCTGGCTGCTACTGGGCAAGCCCTATCGCGAGCGTTTG
GGCTTGGCCTGAGCTAGTAGCTTTTATTTAAACCATTCTTAATTACTGATTA
TACTGTGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTTCAGCAGTG
GATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTA
ATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCA
CTTCCGGGTTAGTCCTGGAAGTATGCCTGTATCAGTGTCCGTACATCAAAC
TTGGTTTTCTTCTTTCCGTGTAGTCGGTGGAGGATATGCCAGATGTGAAGT
GTCTTGCGGCTGATTTCCGATCGGCTGCGAGTCCTTTGAAATGTACAGAAC
TGTAATCTCTTTGCTCGAAAAGCATGGCGTTGCTGATTGTGGAGGCCGTC
CGCGTGGCCAGTCGGCGATCGGTTTGTCTGCTGTGGCTTAATGGAGGAGT
GTTTGATTGCGCGTATGATTGGCTTCGGCTGAACAGGCGCTTATTGGACGT
TCTTTCTGCTATGGCGGTATGGACTGATGAACCGTAGCTATGCGTTGACTT
GGCTTTTGAATTGGCTTTGCTGTTGCGAAGTAGAGTGGCAGTTTCAGCTGT
CGAGGGTTCGACCCATTTGGGAAATTGTGCTGTGCGGCTTCGGTCGTGTGG
CATCTCAATTGGACCTGATATCAGGCAAGATTACCCGCTGAACTTAAGCAT
ATCAATAAGCGGAGGAA

>EU369694.Peronospora.sparsa

GGCTGGCTGCTACTGGGCAAGCCCTATCGCGAGCGTTTGGGCCTTGGCCT
GAGCTAGTAGCTTTTATTTAAACCATTCTTAATTACTGATTATACTGTGGGG
ACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTTCAGCAGTGGATGTCTAG
GCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATT
GCAGG
ATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTCCGGGTTAGTCC
TGGAAGTATGCCTGTATCAGTGTCCGTACATCAAACCTGGTTTTCTTCTTTC
CGTGTAGTCGGTGGAGGATATGCCAGATGTGAAGTGTCTTGCGGCTGATTT
TCGGATCGGCTGCGAGTCCTTTGAAATGTACAGAACTGTACTTCTCTTTGC
TCGAAAAGCATGGCGTTGCTGATTGTGGAGGCTGTCCGCGTGGCCAGTCG
GCGACGGTTTGTCTGCTGTGGCTTAATGGAGGAGTGTTTGATTGCGCGTAT
GATTGGCTTCGGCTGAACAGGCGCTTATTGGACGTTCTTTCTGCTATGGCG
GTATGGACTGATGAACCGTAGCTATGCGTTGACTTGGCTTTTGATTGGCTT



TGCTGTTGCGAAGTAGAGTGGCAGTTTCAGCTGTGCGAGGGTCGACCCATTT
GGGAAATTGTGCTGTGCGGCTTC

>AY608610.*Peronospora.sparsa*.voucher.SMK19410

CCACACCTAAAAAACTTTCCACGTGAACCGTATCAACCAACATAATTGGGG
GTTTGTGGCGGCGGCTGCTGGCATTGTTGTGCTGGCTGGCTGCTACTGG
GCAAGCCCTATCGCGAGCGTTTGGGCCTTGGCCTGAGCTAGTAGCTTTTAT
TTTAAACCATTCTTAATTACTGATTATACTGTGGGGACGAAAGTCTCTGCTT
TTAACTAGATAGCAACTTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATG
AAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTGAGTGAGT
CATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTCCGGGTTAGTCCTGGAAGTATG
CCTGTATCAGTGTCCGTACATCAAACCTGGTTTTCTTCTTTCCGTGTAGTCG
GTGGAGGATATGCCAGATGTGAAGTGTCTTGC GGCTGATTTTTGGATCGGC
TGCGAGTCCTTCAAATGTACAAAACCTGACTTCTCTTTGCTCGAAAAGCGTG
GCGTTGCTGATTGTGGAGGCTGTCCGCGTGGCCAGTCGGCGATCGGTTTG
TCTGCTGTGGCTTAATGGAGGAGTGTGTTGATTGCGGGTATGATTGGCTTCG
GCTGAACAGGCGCTTATTGGACGTTCTTTCTGCTATGGCGGTATGGACTGA
TGAACCGTAGCTATCGTTGACTTGGCTTTTGAATTGGCTTTGCTGTTGCGAA
GTAGAGTGGCAGTTTCGGCTGTGCGAGGGTCGACCCATTTGGGAAATTGTG
CTGTGCGGCTTCGGTCGTGTGGCATCTCAA

>AY225470.*Peronospora.sparsa*.TAS1

CCACACCTAAAAAACTTTCCACGAGGAATCCGTATCAACCCAACATAATTG
GGGTTTTATTTGGCGGCGACTGCTGGCATTGTTGTGCTGGCTGGCTGCTA
CTGGGCAAACCCTATCGCGGAGCGTTTGGGCCTTGGCCTGAACTAGTAGC
TTTTATTTTAAACCCATTCTTAATTACTGATTATACTGTGGGGACGAAAGTCT
CTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACA
TCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCA
GTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTCCGGGTTATCCCTGGA
AGTATGCCTGTATCAGTGTCCGTACATCAAACCTGGTTTTCTTCTTTCCCGT
GTAGTCGGTGGAGGATATGCCAGATGTGAAGTGTCTTGC GGCTGGTTTTC
GGATCGGCTGAGCTCCTTTCAAATGTACAGAACTGACTTCTCTTTGCTCGA
AAAGCGTGGCGTTGCTGATTGTGGAGGCTGTCCGCGTGGCCAGTCGGCG
ATCGGTTTGTCTGCTGTGGCTTAATGGAGGAGTGTGTTGATTGCGGGTATGA
TTGGCTTCGGCTGAACAGGCGCTTATTGGACGTTCTTTCTGCTATGGCGGT
ATGGACTGATGAACCGTAGCTATGCGTTGACTTGGCTTTTGAATGGGCTTT
GCTGTGCGAAGTAGAGTGGCAGTTTCGGCTGTGCGAGGGTCGACCCATTTG
GGAAATTGTGCTGTGCGGCTTCGGTTGAGTGGCATCTCAA

>FM863725.*Peronospora.farinosa*

GAACCGTATCAACCCAATAAATTGGGGTTTTAATTGGCGGCTGCTGCTGGT
AACTTTTTGCTGGCTGGCGGCTGCTGAGCGAATCCTATCGTGAGCGTTCT
GACCTTGGTTGGAGCTAGTAACTTAAATTTTAAACCCATTCTTAAATACTGA
ATATACTGTGGGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTTCAGC



AGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATA
CGTAAGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCATCGAAATTTGAACGCATATT
GCACTTCCGGGTTATCCCTGGAAGTATGCCTGTATCAGTGTCCGTACATTA
AACTTGGTTTTCTTCTTCCGTGTAGTCGGTGGAGGATATGCCAGATATGAA
GTGTCTTGTGGCTGGTTTTCGAATCGGCTGTGAGTCCTTTGAAATGTATAG
AACTGATTCTTTTGTTCGAAAAGCGTGGCGTTGCTGGTTGTGAAGGCTGTC
AGTGTGACTAGTCGGCGACCGGTTTGTCTGCTATGGCATAAATGGAGGAG
TGTTTCGATTCGCGGTATGATTGGCTTCGGCTGAACAGGCGCTTATTAGACG
TTCTTCCTGCTGTGG

CGGTATGACCTGGTGAACCGTAGTTCATGCACGACTTGGCTTTTGAATTGG
CTTTGCTGTGTGAAGTAGAGTGACAGTTTCGGCTGTTCGAGGATCGACCCAT
TTGGGAAATTGTGCTGTGCGACTTCGGTTGCGTGGCATCTCAATTGGACCT
GATATCAGGCAAGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATTATA

>EU562211.Phytophthora.cinnamomi.voucher.CCF3763

CCACACCTAAAAACTTTCCACGTGAACCGTATCAACCCAATTAGTTGGGG
GCCTGCTCTGGGCGGCGGCTGTTCGATGTCAAAGTCGACGGCTGCTGCTG
CGTGGCGGGCCCTATCACTGGCGAGCGTTTGGGTCCCTCTCGGGGGAAC
TGAGCTAGTAGCCTCTCTTTTAAACCCATTCTGTAATACTGAACATACTGTG
GGACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCAGTGGATGT
CTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCG
AATTGCAGGATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTCCG
GGTTAGTCCTGGGAGTATGCCTGTATCAGTGTCCGTACATCAAATTGGCT
CTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGATGGAGGTGCCAGACGTGAGGTGTCT
TGCGGGCGGTCTTCGGACTGGCTGTGAGTCCCTTGAATGTACTGAACTG
TACTTCTCTTTGCTCGAAAAGCGTGACGTTGCTGGTTGTGGAGGCTGCCTG
TATGGCCAGTCGGCGANCGTTTTGTCTGCTGCGGCGTTTAAATGGAGGAGT
GTTTCGATTCGCGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAAAGCGCTTATTGGATG
TTCTTCCTGCTGTGGCGGTACGGATCGGTGAACCGTAGCTGTGCTAGGCT
TGCGGTTTGAACCGGCGGTGTTGTTGCGAAGTAGGGTGGCGGCTTCGGCT
GTCGAGGGTCGATCCATTTGGGAACTCTGTGTCTCTGCGGCGCACTTGTG
TGCTTGTGGTGGCATCTCAATTGGACCCTA

>P. sparsastrain 5VZ

AGCCGCAAGACACTTCACATCTGGCATATCCTCCACCGACTACACGGAAAG
AAGAAAACCAAGTTTGATGTACGGACACTGATACAGGCATACTTCCAGGAC
TAACCCGGAAGTGCAATATGCGTTCAAATTTTCGATGACTCACTGAATCCT
GCAATTCGCATTACGTATCGCAGTTCGCAGCGTTCTTCATCGATGTGCGAG
CCTAGACATCCACTGCTGAAAGTTGCTATCTAGTTAAAAGCAGAGACTTTC
GTCCCCACAGTATAATCAGTAATTAAGAATGGTTTAAAATAAAAGCTACTAG
CTCAGGC

>AY618222.Botryotinia.fuckeliana

AGGGTAGACCTCCCACCCTTGTCGTATTACTTTGTTGCTTTGGCGAGC
 TGCCTTCGGGCCTTGTATGCTCGCCAGAGAATACCAAACCTCTTTTTATTAA
 TGTCGTCTGAGTACTATATAATAGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGG
 TTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGC
 AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATT
 CCGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTTAGCTTGGT
 ATTGAGTCTATGTCAGTAATGGCAGGCTCTAAAATCAGTGGCGGCGCCGCT
 GGGTCTGAACGTAGTAATTATCTCTCGTTACAGTTCTCGGTGTGCTTCT
 GCCAAAACCCAAATTTTTCTATGGTTGACCTCGGATC

(2) DATOS PARA LA ELABORACIÓN DEL ÁRBOL FILOGENÉTICO.

No. De Accesión	Organismo	Aislamiento	País	Autor
AF266783	<i>Peronospora sparsa</i>	IMI344695	Dundee, Tayside DD2 5DA, UK	Cooke, D.E.L., Dreth, A., Duncan, J.M., Wages, G. and Brasier, C.M.
EU369694	<i>Peronospora sparsa</i>	-----	Morelia, Michoacan, Mexico	Rebollar-Alviter, A., Silva-Rojas, H.V. and Zelaya-Molina, L.X.
EU391654	<i>Peronospora sparsa</i>	TS2-1	Frederiksberg, Dinamarca	Sundelin, T., Collinge, D.B. and Lubeck, M.
DQ887773	<i>Peronospora sparsa</i>	-----	Medellin, Antioquia, Colombia	Marin, M.A., Ayala, M., Argel, L. E. and Jaramillo, S.
EU601170	<i>Peronospora sparsa</i>	FEHSSA (Fruto sintomático) <i>Rubus fruticosus</i>	Morelia, Michoacan, Mexico	Rebollar-Alviter, A., Silva-Rojas, H.V., Zelaya-Molina, L.X. and Ellis, M.A.
EU601168	<i>Peronospora sparsa</i>	HSSA (Hojas asintomáticas) <i>Rubus fruticosus</i>	Morelia, Michoacan, Mexico	Rebollar-Alviter, A., Silva-Rojas, H.V., Zelaya-Molina, L.X. and Ellis, M.A.
EU601171	<i>Peronospora sparsa</i>	HSSFEA (Hojas asintomáticas) <i>Rubus fruticosus</i>	Morelia, Michoacan, Mexico	Rebollar-Alviter, A., Silva-Rojas, H.V., Zelaya-Molina, L.X. and Ellis, M.A.
EU601169	<i>Peronospora sparsa</i>	HCST (Hojas sintomáticas) <i>Rubus fruticosus</i>	Morelia, Michoacan, Mexico	Rebollar-Alviter, A., Silva-Rojas, H.V., Zelaya-Molina, L.X. and Ellis, M.A.
DQ874345	<i>Peronospora sparsa</i>	SMK 18380, <i>Sanguisorba officinalis</i>	Seoul, Korea	Choi, Y.J., Constantinescu, O. and Shin, H.D.
DQ874344	<i>Peronospora sparsa</i>	SMK 17872, <i>Sanguisorba officinalis</i>	Seoul, Korea	Choi, Y.J., Constantinescu, O. and Shin, H.D.
DQ874343	<i>Peronospora sparsa</i>	SOMF 14086, <i>Rubus sp.</i>	Seoul, Korea	Choi, Y.J., Constantinescu, O. and Shin, H.D.
DQ874346	<i>Peronospora sparsa</i>	SMK 19228, <i>Sanguisorba officinalis</i>	Seoul, Korea	Choi, Y.J., Constantinescu, O. and Shin, H.D.
DQ874342	<i>Peronospora sparsa</i>	SOMF 15575, <i>Potentilla reptans</i>	Seoul, Korea	Choi, Y.J., Constantinescu, O. and Shin, H.D.
AY608610	<i>Peronospora sparsa</i>	SMK19410, <i>Rosa multiflora</i>	Seoul, Korea	Choi, Y.J., Shin, H.D. and Hong, S.B.
AY225470	<i>Peronospora sparsa</i>	TAS1	Burnie, Tasmania, Australia	Scott, J.B., Hay, F.S. and Wilson, C.R.
FM863725	<i>Peronospora farinosa</i>	MINPER, <i>Atriplex hortensis</i>	Madrid, España	García-Blázquez G / Martin, M.
EU562211	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	CCF 3763, <i>Rhododendron</i>	Brno, Republica Checa	Mrazkova, M., Cerny, K. and Tomsovsky, M.
AY618222	<i>Botryotinia fuckeliana</i>	olrim749, <i>Picea abies</i>	Uppsala, Suecia	Vasiliauskas, R., Lygis, V. and Stenlid, J.