



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

PRODUCCIÓN DE SEMILLAS

IDENTIFICACIÓN FILOGENÉTICA DE HONGOS Y BACTERIAS AISLADAS
DE MATERIAL PROPAGATIVO USADO COMO SEMILLA EN ARÁNDANO
(*Vaccinium corymbosum* L.)

MARÍA DEL ROSARIO RAMÍREZ MENDOZA

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2014

La presente tesis titulada: **Identificación filogenética de hongos y bacterias aisladas de material propagativo usado como semilla en arándano (*Vaccinium* sp.)** realizada por la alumna: **María del Rosario Ramírez Mendoza** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

PRODUCCIÓN DE SEMILLAS

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA



Dra. Hilda Victoria Silva Rojas

DIRECTOR



Dr. Ángel Rebolgar Alviter

ASESOR



Dr. Eduardo Molina Gayosso

ASESOR



Dr. Paulino Pérez Rodríguez

Montecillo, Texcoco, Estado de México, de 2014

RESUMEN

El arándano azul (*Vaccinium corymbosum* L.) es una frutilla de elevado potencial económico. Producido comercialmente en 20 países. En México, los estudios relacionados al cultivo de arándano son escasos, específicamente en material propagativo usado como semilla comparado con otros cultivos de exportación como el aguacate o fresa. Asimismo, no se cuenta con un programa de certificación que pueda ayudar a la regulación y detección de patógenos en material propagativo de arándano, comprometiendo así la sanidad del cultivo en el país. En el presente estudio se identificaron filogenéticamente hongos y bacterias cultivables asociados a material propagativo de arándano utilizado como semilla.

A partir de tejido necrótico de plantas obtenidas de uno de los viveros de mayor importancia de la región productora de los Estados de Michoacán y Jalisco, México. Para la identificación y filogenia multi-gen de las cepas aisladas se secuenciaron seis genes Housekeeping (ACT, CHS-1, GAPDH, HIS3, TUB2, TEF e ITS). De forma individual los genes ACT, CHS-1, GAPDH, HIS3, TUB2, TEF, no tuvieron una resolución a nivel de especie, el ITS y el análisis multilocus basado en inferencia Bayesiana tuvieron un mejor arreglo de las especies encontradas. Todos los hongos encontrados en el presente estudio, están asociados a la planta como parásitos pudiendo o no causar un proceso de patogenesis. Este es de utilidad para productores de plántulas en vivero.

Palabras clave: *Vacciniumcorymbosum*, México, *Housekeeping*, multilocus.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de la Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo brindado para realizar mis estudios de Postgrado.

A la Dra. Hilda Victoria Silva Rojas por su gran capacidad para orientarme en el mundo de la ciencia, la realización de esta tesis y sabios consejos.

Al Dr. Ángel Rebollar Alviter por su participación y orientación para la realización de la presente.

Al Dr. Eduardo Molina Gayosso por sus sabias aportaciones en esta tesis y en mi vida.

A César, sin ti no hubiera sido posible terminar este trabajo, muchas gracias por todo tu apoyo y conocimiento.

Al Ing. José Antonio Rodríguez Herrera por su amistad de todos estos años y su compañía en la maestría.

Al Laboratorio de Biotecnología y Patología de Semillas, y a la señora Silvia Antero por su amistad brindado en todos estos años.

A la Línea Prioritaria de Investigación LPI5: Biotecnología Microbiana, Vegetal y Animal, por la disponibilidad de los equipos utilizados en la presente investigación.

DEDICATORIA

A mis padres que me permitieron soñar

A mis hermanos por hacerme sonreír

A ti.... Muchas gracias

"Las murallas de ladrillos están allí por una razón: nos dan la oportunidad de demostrar cuán intenso es nuestro deseo por algo".

(Pausch, 2008)

CONTENIDO

RESUMEN	Pág.
ABSTRACT	
AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA	ii
ÍNDICE GENERAL	iii
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
I. INTRODUCCIÓN GENERAL	11
1.1 Justificación	13
1.2 Planteamiento del problema	14
1.3 Objetivos	14
1.4 Hipótesis	14
II. REVISIÓN DE LITERATURA	15
2.1 Origen y distribución del arándano	15
2.2 Taxonomía del cultivo	17
2.3 Importancia	19
2.3.1 Importancia mundial	19
2.3.2 Importancia nacional	20
2.4 Principales enfermedades del cultivo	21
2.4.1 Mundial	21
2.4.2 Nacional	22
2.5 Identificación filogenética de hongos y bacterias	23
2.5.1 Uso de la subunidad pequeña del ribosoma 16S rDNA	23
2.5.2 Uso del Espacio Transcrito Interno (ITS)	25
2.5.3 Uso de la Técnica Multilocus (MLST)	29

III. MATERIALES Y MÉTODOS	38
3.1 Obtención de material vegetal	38
3.2 Aislamiento de microorganismos cultivados	38
3.3 Análisis molecular	39
3.3.1 Extracción de DNA	39
3.3.1.1 Hongos	39
3.3.1.2 Procariotes	39
3.3.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	40
3.3.2.1 Amplificación del Espacio Transcrito Interno (ITS)	40
3.3.2.2 Amplificación de la subunidad pequeña del ribosoma 16S rDNA	41
3.3.2.3 Amplificación de genes <i>housekeeping</i> para hongos	41
3.3.3 Electroforesis horizontal en gel	43
3.3.4 Limpieza de producto de PCR	43
3.3.5 Secuenciación Sanger	44
3.3.6 Construcción de árboles filogenéticos	44
3.3.7 Análisis multilocus	45
IV. RESULTADOS	46
V. DISCUSIÓN	70
VI. CONCLUSIONES	73
VII. LITERATURA CITADA	74

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1	Relación de iniciadores para la amplificación del Espacio Transcrito Interno (ITS) del rDNA en eucariotas	Pág. 28
Cuadro 2	Relación de iniciadores para la amplificación de genes del género <i>Pseudomonas</i> y relacionados.	31
Cuadro 3	Iniciadores universales de β -tubulina y gama de organismos. Los iniciadores con las letras iniciales de F por hongos, A para los animales, y P para plantas; la letra r denota los iniciadores inversos.	34
Cuadro 4	Iniciadores para amplificación del gen actina en ascomicetos	35
Cuadro 5	Relación de iniciadores utilizados para la amplificación de genes <i>housekeeping</i> presentes en organismos eucariotas.	42
Cuadro 6	Relación de aislamientos de hongos amplificados con cada uno de los genes <i>housekeeping</i> utilizados.	51
Cuadro 7	Variación de los genes, Actina, Quintin sintasa, Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, Histona 3, β -Tubulina, Factor de elongación 1α y Espacio Interno Transcrito en hongos aislados de <i>Vaccinium corymbosum</i> .	68
Cuadro 8	Variación del gen 16s rRNA en bacterias aisladas de <i>Vaccinium corymbosum</i>	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Distribución mundial de <i>Vaccinium corymbosum</i> basado en Plantwise, 2013.	Pág. 15
Figura 2	Diagrama de la estructura básica de los genes rRNA que codifican para eucariotas basado en Weider et al. (2005); modificado a partir de Sterner and Elser (2002).	26
Figura 3	Mapa de la región del gen <i>tef-1α</i> , mostrando intrones y exones. O'Donnell et al. (1998).	37
Figura 4	(A) Planta de 5 meses de edad de <i>Vaccinium corymbosum</i> . (B) Tallo inferior mostrando parte de tejido sano y necrótico. (C) Tallo medio con tejido sano y necrótico. (D) Tallo superior con tejido sano y necrótico. (E) Hojas de la parte alta, media y baja con tejido sano y necrótico y (F) Raíces.	46
Figura 5	Amplificación por PCR del Espacio Transcrito Interno del rDNA de los 26 aislamientos de hongos obtenidos de <i>V.corymbosum</i> , con un tamaño de banda esperado de ~ 580 bp.	47
Figura 6	Amplificación por PCR de la subunidad pequeña del ribosoma 16S rDNA de los 28 aislamientos de bacterias obtenidos de <i>V.corymbosum</i> , con un tamaño de banda esperado de ~1500 bp.	48
Figura 7	Amplificación por PCR de los genes multilocus (A) Actina, (B) Quitin Sintasa, (C) Gliceraldehido-3- fosfato, (D) Histona 3, (E) β -Tubulina y (F) Factor de elongación 1 α . De aislamientos de hongos obtenidos de plantas de <i>V. corymbosum</i> de 5 meses de edad sembradas en almacigo. Aislamientos de hongos de Tallo bajo 2-11,13, 15, Tallo medio 17 y 18; Raíz 12,14. Hoja baja 1.	50

- Figura 8** Árbol filogenético con inferencia bayesiana de 36 aislamientos. El árbol fue construido usando secuencias de ITS, con el programa Mr. BAYES. La desviación estándar final obtenida fue de 0.0042. **54**
- Figura 9** Árbol filogenético con inferencia bayesiana de 36 aislamientos. El árbol fue construido usando secuencias de β -TUB con el programa Mr. BAYES., la desviación estándar final obtenida fue de 0.005. **57**
- Figura 10** Árbol filogenético con inferencia bayesiana de 36 aislamientos. El árbol fue construido usando secuencias de Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, con el programa Mr. BAYES. la desviación estándar final obtenida fue de 0.005. **59**
- Figura 11** Árbol filogenético con inferencia bayesiana de 36 aislamientos. El árbol fue construido usando secuencias de Factor de elongación 1 α , con el programa Mr. BAYES. la desviación estándar final obtenida fue de 0.0068. **61**
- Figura 12** Árbol filogenético con inferencia bayesiana de 36 aislamientos. El árbol fue construido usando secuencias de Histona 3, con el programa Mr. BAYES. la desviación estándar final obtenida fue de 0.0040. **63**
- Figura 13** Árbol filogenético con inferencia bayesiana de 36 aislamientos. El árbol fue construido usando secuencias concatenadas de Actina, β -Tubulina, Histona 3, Quitin sintasa, Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, Factor de elongación 1 e ITS, con el programa Mr. BAYES, la desviación estándar final obtenida fue de 0.006. **65**
- Figura 14** Árbol filogenético con inferencia bayesiana de 26 aislamientos de bacterias. El árbol fue construido usando secuencias del gen 16s rRNA, con el programa Mr. BAYES, la desviación estándar final **67**

obtenida fue de 0.004.

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

El arándano azul (*Vaccinium corymbosum* L.) es una *Ericaceae* nativa del este de los Estados Unidos, fue domesticado a finales del siglo XIX por los inmigrantes procedentes de Europa, quienes la trasplantaron a campos en los estados de Nueva Inglaterra y Florida (Hancock et al., 2008).

El arándano azul es un cultivo de alto valor agronómico debido a que puede crecer en suelos ácidos, poco drenados los cuales son considerados no aptos para otros cultivos (Ratnaparkhe, 2007). Otra característica por el cual se le considera importante, es debido a su valor nutrimental, ya que es uno de los frutos más ricos en antioxidantes (Alkharouf et al., 2007). Su fruto se utiliza en una amplia variedad de formas como: repostería, yogurt, helado, para preparación de *muffins*, panques y cereales (Caruso y Ramsdell, 1995); se puede consumir también de manera fresca (Hancock et al., 2008).

El arándano azul es producido comercialmente en 20 países, de los cuales Estados Unidos y Canadá tienen la mayor producción alcanzando juntos 5, 269,107 t de arándano comercial por año. Otros países productores son: Polonia, México, Alemania, Países Bajos, Suecia, Nueva Zelanda, Lituania, Federación de Rusia, Rumania, Francia, Italia, España, Uzbekistán, Ucrania, Suiza, Portugal, Bulgaria y Marruecos.

Las tres especies de mayor importancia económica son: Arbusto alto (*Vaccinium corymbosum*), arbusto bajo (*V. angustifolium*) y ojo de conejo (*V. ashei*). Sin embargo, la mayor parte de la producción mundial de arándano es de la especie *V. corymbosum* (Ratnaparkhe, 2007).

Actualmente México ocupa el cuarto lugar en la producción mundial con 6,704 t (FAOSTAT, 2011)¹, las cuales son producidas en los estados de Jalisco, Baja California, Michoacán, Puebla y Estado de México (SIAP, 2011)²; siendo la especie *V. corymbosum* la más cultivada en el país, al igual que en otros países del mundo. Con relativamente poco tiempo en el país, la superficie actual de arándano ya empieza a manifestar problemas fitosanitarios no registrados en México.

Ante esta situación, resulta de gran importancia el conocimiento de las comunidades microbianas que se encuentran en el material utilizado para la propagación vegetativa del cultivo, ya que en sus inicios las plantaciones iniciales se establecieron con material propagativo proveniente de países como Chile, Estados Unidos y Argentina.

Con la finalidad de conocer si existen microorganismos fitopatógenos que se transmiten a través de esta vía, se considera necesario realizar investigaciones en el cultivo que permitan sentar las bases para un programa de certificación de material propagativo de arándano. La información generada servirá reducir el riesgo de introducción de fitopatógenos como bacterias, hongos y oomicetos que amenazan la producción del arándano comercial.

¹ FAOSTAT <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> (Accesado enero, 2013).

² SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera) <http://www.siap.gob.mx> (Accesado enero, 2013).

Por esta razón se consideró necesario iniciar estudios con el fin de que permitan conocer la identificación y distribución de las comunidades microbianas en el material propagativo que se va a utilizar como semilla en las principales áreas productoras de arándano del país, debido a que se ha observado que a medida que se incrementa el cultivo también se han incrementado los problemas fitosanitarios.

1.1 Justificación

En México, la superficie sembrada con arándano para el año 1993 era de 175 ha (SIAP, 2012)³, las cuales se encontraban solo en el estado de Puebla; actualmente, la superficie sembrada es de 1153 ha, las cuales están distribuidas en los estados de Baja California (80 ha), Jalisco (533 ha), Estado de México (11 ha), Michoacán (98 ha), Puebla (76 ha), Sinaloa (77 ha), Sonora (34 ha) y Colima (222 ha) (SIAP, 2012)⁴. En estas áreas productoras se han incrementado los problemas fitosanitarios, ante esta situación, resulta de gran importancia el conocimiento de los microorganismos cultivados como hongos, oomycetos y bacterias que se encuentran en el material utilizado para la propagación de este cultivo.

³ SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera) <http://www.siap.gob.mx> (Accesado junio, 2014).

⁴ SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera) <http://www.siap.gob.mx> (Accesado junio, 2014).

1.2 Planteamiento del problema

El cultivo de arándano es relativamente nuevo en México, por lo cual no se le ha prestado atención suficiente, y la regulación fitosanitaria no está bien establecida. En México, los estudios relacionados al cultivo de arándano son escasos, específicamente en material propagativo usado como semilla comparado con otros cultivos de exportación como el aguacate o fresa. Asimismo, no se cuenta con un programa de certificación que pueda ayudar a la regulación y detección de patógenos en material propagativo de arándano, comprometiendo así la sanidad del cultivo en el país.

Por lo anterior, en el presente trabajo tiene el siguiente objetivo:

Objetivos

- a) Identificar filogenéticamente hongos y bacterias cultivables asociados a material propagativo de arándano utilizado como semilla.

1.4. Hipótesis

El material propagativo de arándano puede estar infectado con hongos y bacterias que podrían ser fuente de infección primaria para el desarrollo de epidemias en campo.

a crecer sustancialmente. El área cubierta por arándano creció de menos de 100 ha en 1940 a alrededor de 1000 ha en 1955, y a más de 5500 ha en 1965 (Bell, 2006).

Para inicios de 1970 en Norte América la mayor concentración de arándano azul se localizó en New Jersey (3000 ha) y Michigan (3100 ha), seguido por North Carolina (1640 ha) y después Washington (370 ha). A mediados de 1970 y principios de 1980 el área de arándano continuó expandiéndose, y nuevas plantaciones comenzaron a aparecer en British Columbia y Oregón. El área cubierta por arándano azul incrementó de 370 a 1,540 ha. (Retamales and Hancock, 2012).

Fuera de Norte América, la primera plantación de arándano azul fue hecha en Assen, Países Bajos en 1923 por Borgesius. En Alemania se introdujo en 1930 por el Dr. Walter Heermann quien también comenzó con el mejoramiento genético y la utilización de técnicas de producción comercial. Otras plantaciones tempranas fueron hechas por David Trehane en Reino Unido en 1959. En Australia y Nueva Zelanda las primeras plantaciones de arándano fueron en 1960 y 1970, se utilizó principalmente como cultivo de exportación. De 2003 a 2008, el número de hectáreas en Australia aumentó de 520 a 600 ha y en Nueva Zelanda de 405 a 530 ha (Retamales and Hancock, 2012).

Las primeras plantaciones de arándano en Asia fueron en 1950. Una industria importante emergió en Japón a finales de 1980 (180 ha), pero solo unos pocos arándanos fueron plantados en China recientemente. De 2003 a 2008 en China la superficie de arándano azul incremento de 51 a 1190 ha y en Japón de 355 a 860 ha (Retamales and Hancock, 2012).

El arándano azul fue llevado a Sudáfrica en 1970, pero no se incrementó la superficie sembrada hasta 1990, en el 2000 alcanzó 350 ha, el cual ha disminuido a 200 ha, la

producción está dispersa a través del país, con una concentración a lo largo de Ciudad del Cabo, Free State y Lydenburg (Greef and Greef, 2006).

Las primeras plantaciones comerciales en países europeos como Polonia, Países Bajos e Italia fueron establecidas en 1970. En Francia la plantación de arándanos comenzó en 1980 y en España en 1990.

El número de hectáreas sembradas con arándano azul a través de Europa permaneció pequeño hasta 1990, que la superficie cultivada aumentó de 1,000 a 4,000 ha, dándose el mayor crecimiento en Polonia (1,520 ha) y Alemania (1,370 ha). Desde 2003 el número de hectáreas en Europa ha continuado creciendo en un 86%, aproximadamente 7,400 ha. Igual tasa de crecimiento se ha observado en España, Portugal, Polonia, Italia y Alemania.

Las primeras plantaciones de arándano azul en Sudamérica se hicieron en Chile en 1980 y en Argentina en 1990. Para el 2003, Chile tenía 2,135 ha y en Argentina 710 ha. Continuó un fuerte crecimiento de 2003 a 2008, teniendo Chile 11,300 ha y Argentina 4,470 ha. En Uruguay han emergido recientemente un número significativo de hectáreas (665 ha) (Taquini, 2006).

A principios del 2000, hubo otro auge de siembra de arándanos, y California emergió por primera vez como un importante estado creciente de arándano, junto con México.

2.2 Taxonomía del cultivo

Reino	Plantae
Sub reino	Viridaeplantae
Infra reino	Streptophyta
División	Tracheophyta
Subdivisión	Spermatophyta
Infradivisión	Angiospermae
Clase	Magnoliopsida
Súper orden	Asteranae
Orden	Ericales
Familia	Ericaceae
Subfamilia	Vaccinioideae
Tribu	Vaccinieae
Género	Vaccinium
Especie	<i>Vaccinium corymbosum</i> L.

Fuente: NCBI, 2013⁶ y ITIS, 2013⁷

Las especies cultivadas más importantes de *Vaccinium* se encuentran en la sección de *Cyanococcus*, *Oxycoccus*, *Viti –Idea*, *Myrtillus* y *Vaccinium* y la mayor producción viene de especies en la sección de *Cyanococcus* incluye cultivares de *V. corymbosum*, *V. ashei* y *V. angustifolium* (Song and Hancock, 2011).

Siendo las especies predominantes de arándano cultivado *V. corymbosum* (arbusto alto), *V. ashei* syn. *V. virgatum* (ojo de conejo) y *V. angustifolium* (arbusto bajo). Los cultivares de *V. corymbosum* son separados en norteño, sureño y tipos intermedios dependiendo de sus requerimientos de frío y resistencia al invierno (Rowland et al., 2011).

⁶ NCBI (National Center for Biotechnology Information) Taxonomy Browser
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=69266> (Accesado mayo, 2013).

⁷ ITIS (Integrated Taxonomic Information System)
http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=23573 (Accesado mayo, 2013).

La familia *Ericaceae* contiene aproximadamente 450 especies con una amplia distribución geográfica en el hemisferio norte, y en las montañas tropicales de Asia y Centro y Sudamérica. Unas pocas especies se han encontrado en África y Madagascar, así como 92 especies en China. El Sur este de Asia (Archipiélago Malayo, Nueva Guinea, India, China y Japón) es el origen de casi el 40% de especies de *Vaccinium*. Cerca del 35% de especies son nativas de América incluido 25% en Norte América y 10% en Sur y Centro América, el resto, cerca de 25% están ampliamente dispersas en todo el mundo (Song and Hancock, 2011).

La primera especie en ser domesticada fue *V. corymbosum* por Frederick Coville del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) quien estableció los requerimientos del arándano, la forma de propagación por estacas y dio inicio al mejoramiento con ayuda de un productor privado de New Jersey, Elizabeth White (Ehlenfeld, 2009).

2.3 Importancia del cultivo

2.3.1 Importancia mundial

El arándano azul se ha convertido en un cultivo internacional, ya que actualmente la superficie sembrada de arándano se ha incrementado, debido a que la producción se ha expandido a nuevas regiones (Retamales and Hancock, 2012) siendo ampliamente sembrado en Norte América, Sudamérica, Europa, China y Japón. La mayor parte de este crecimiento ha venido en los últimos 10 a 20 años, debido a que el arándano azul es una fuente importante de antioxidantes para el ser humano, esta característica se le atribuye por su alta concentración de componente fenólicos, particularmente antocianinas, característica

que ha contribuido al crecimiento del cultivo (Colin and Bruce, 2002). El arándano azul es uno de los arándanos comercialmente más importante con una producción mundial para el año 2001 de 56,511 t, y para el año 2011 de 356, 533 t con una superficie sembrada de 81,091 ha, esto representa un aumento de 630% en 10 años.

Actualmente, Estados Unidos es el mayor productor de arándano con el 55% de la producción mundial, posteriormente sigue Canadá con 31% y el resto está dividido en Polonia, México, Chile, Alemania, Países Bajos, Suecia, Nueva Zelandia, Lituania, Rumania, Francia. Siendo los principales exportadores Estados Unidos y Canadá (FAO, 2011)⁸.

2.3.1 Importancia Nacional

México ocupa el cuarto lugar como país productor de arándano azul a nivel mundial con una producción de 7,190 t, sembradas en una superficie de 1,153 ha, de las cuales solo 884.50 ha son cosechadas (SIAP, 2012). La producción está ubicada en los Estados de Baja California en el municipio de Ensenada con una superficie sembrada de 80 ha y una producción de 196.8 t, Jalisco en los municipios de Amacueca, Autlán de Navarro, Concepción de Buenos Aires con 546 t, Gómez Farías con 15.2 t, Mazamitla 86.5 t, Pihuamo con 180 t, San Gabriel, Sayula, Tamazula de Gordiano con 18 t, Tapalpa 12 t, Tuxpan con 1,650 t, Zapotiltic con 3,125 t, Zapotlán El Grande (Ciudad Guzmán) con 75.6 t y Zocalco de Torres. Estado de México con los municipios de Valle de Bravo con 3 t y Villa del Carbón con 19 t y Michoacán con los municipios de Peribán con 120 t, Los Reyes

⁸ FAO(Food and Agriculture Organization of the United Nations)
http://faostat3.fao.org/home/index_es.html?locale=es#DOWNLOAD (Accesado mayo,2013)

con 324 t y Tangancicuaro con 108 t, Puebla en el municipio de Zacatlán con 224 t. El total de la producción nacional tiene un valor de 156, 178,000.65 pesos (SIAP, 2011)⁹.

México es uno de los importadores de arándano azul fresco a Estados Unidos, pese a su poca producción, muestra un gran potencial a largo plazo, por la época de producción y cercanía que presenta con su principal mercado que es Estados Unidos.

2.4 Principales enfermedades del cultivo

Con la creciente demanda de los consumidores de arándano azul en el mundo, derivado en gran medida por los beneficios a la salud, los productores han reaccionado incrementando la producción intensiva y el número de hectáreas. A medida que el área de producción ha ido creciendo, la demanda de material propagativo ha aumentado considerablemente (Haralson et al., 2013) y junto con el incremento de la demanda de material propagativo, los problemas de enfermedades se han vuelto más prevalentes (Scherm et al., 2001).

2.4.1 Mundial

Probablemente las enfermedades de arándano azul más generalizadas son causadas por los siguientes patógenos: *Phytophthora cinnamomi* Rands (Retamales and Hancock, 2012), *Monilinia vaccinii-corymbosi* (Reade), *Botryosphaeria* spp., *Botryosphaeria corticis* (Demaree and Wilcox), *Phomopsis vaccinii* Shear, *Botrytis cinerea* Pers.: Fr., *Alternaria*

⁹ SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera) <http://www.siap.gob.mx> (Accesado mayo,2013)

spp., *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc., *Colletotrichum acutatum*¹⁰, *Pestalotiopsis* spp. y *Truncatella* sp. (Espinoza et al., 2008), *Calonectria colhounii* (anamorfo *Cylindrocladium colhounii*) (Sadowsky et al., 2011), *Dothichiza caroliniana* (Baino et al., 2007), *Pucciniastrum vaccinii* (Sugiyama et al., 2008), *Armillaria* spp. (Prodorutti et al., 2009), *Thekopsora minima* (Rebollar-Alviter et al., 2011), *Pseudomonas syringae* (Retamales and Hancock, 2012) y *Xylella fastidiosa* (Holland et al., 2013), fitoplasmas como el blueberry stunt phytoplasma y virus, *Blueberry shoestring virus* (BBSSV), *Blueberry shock virus* (B1ShV), *Tomato ringspot virus* (TmRSV) y el *Blueberry scorch virus* (B1ScV).

2.4.2 Nacional

Se ha reportado la presencia de *Thekopsora minima* (Rebollar-Alviter et al., 2011), *Neofusicoccum parvum*, *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, *Pestalotiopsis photiniae*, *Pestalotiopsis microspora* y *Phytophthora cinnamomi* (Rebollar-Alviter et al., 2013) y en información no reportada se encuentra: *Alternaria* sp., *Colletotrichum* sp., *Phomopsis* sp., *Neofusicocum* sp., *Stemphylium* sp., *Curvularia* sp., *Fusarium* sp., *Phoma* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Phyllosticta* sp., *Bipolaris* sp., *Chaetomium* sp., *Phytophthora* sp. y *Pythium* sp. (Cruz-Francisco, 2011).

¹⁰ SMML (Systematic Mycology and Microbiology Laboratory Fungus-Host Database) http://nt.ars-grin.gov/fungalatabases/fungushost/new_frameFungusHostReport.cfm (Accesado junio, 2013).

2.5 Composición e identificación filogenética de hongos y bacterias

La filogenia molecular apoya cada vez más la comprensión de la diversidad y proporciona la base para la clasificación de los organismos, haciendo un análisis comparativo de secuencias de RNA ribosomal o de genes *housekeeping*, en la actualidad es el método más utilizado para la construcción de la filogenia microbiana (Ludwig and Schleifer, 1994). La clasificación filogenética de microorganismos basada en secuencias del gen rRNA ofrece un marco bien definido que puede ser utilizado para desarrollar herramientas moleculares para la identificación (Rantakokko-Jalava et al., 2000).

2.5.1 Uso de la subunidad pequeña del ribosoma 16S rRNA

La historia de la evolución molecular de los microorganismos en gran parte se ha basado en la utilización de la subunidad pequeña del RNA ribosomal (Francino et al., 2006), en procariotes el ribosoma está formado por la subunidad pequeña 30S y la subunidad grande 50S, que conforman la unidad funcional 70S del ribosoma. La subunidad pequeña contiene a la molécula de 16S rRNA (~1600 nucleótidos), mientras que la subunidad grande contiene un 5S (~120 nucleótidos) y una molécula de 23S rRNA (~3000 nucleótidos) (Weider et al., 2005). La molécula de rRNA está formada por regiones con secuencias variables (Rantakokko-Jalava et al., 2000) intercaladas con secuencias altamente conservadas a nivel de especie, género o reino (Wilson et al., 1990).

Para análisis filogenéticos basados en rRNA se han utilizado el 5S y 16S en gran parte por razones históricas y técnicas. El 5S rRNA se utilizaba porque era relativamente pequeño y permitía el análisis de las secuencias para finales de 1960, pero su poca variación de nucleótidos limitaba su utilidad filogenética. El 16S rRNA tiene un tamaño

apropiado para un amplio análisis filogenético, pero era demasiado grande para completar toda la secuencia, hasta el desarrollo de protocolos de clonación y secuenciación (Olsen et al., 1986). Uno de los primeros trabajos de filogenia basados en el gen 16S rRNA fue el de Woese and Fox para estudiar las relaciones evolutivas entre bacterias (Woese and Fox, 1977) subsecuentemente, varios autores han identificado/construido y publicado árboles filogenéticos basados en secuencias del gen 16S rRNA.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) basada en el análisis del gen 16S rRNA es una herramienta poderosa y esencial para los estudios de diversidad bacteriana, estructura de la comunidad, evolución y taxonomía (Hongoh et al., 2006). Para el año 1991, con la disponibilidad de secuenciadores en términos de costos, metodología y tecnología mejoraron de tal manera que muchos centros de investigación pudieron tener acceso a ellos (Janda and Abbott, 2007). La amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA se implementó en los laboratorios como parte de la identificación rutinaria de aislamientos bacterianos (Keller et al., 2010); se utilizaron iniciadores de amplio rango que reconocen secuencias conservadas y variables del 16S rDNA en una amplia diversidad de bacterias (Bosshard et al., 2003). El par de iniciadores más comunes, diseñados que reconocen en regiones conservadas del gen 16S rRNA eubacterial, son el iniciador forward 8F que se ancla en las posiciones 8 a 27 del gen 16S rRNA de *Escherichia coli* (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y el iniciador reverse 1492R que reconoce posiciones complementarias 1510 a 1492 (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') los cuales flanquean la mayor parte del gen (Eden et al., 1991).

La resolución de la secuencia del gen 16S rRNA en análisis entre especies cercanamente relacionadas es bajo (Coenye et al., 2004), pero permite conocer la relación entre especies muy distantes (Woese and Fox, 1977).

2.5.2 Uso del Espacio Transcrito Interno (ITS)

El espacio transcrito interno (ITS) del DNA ribosomal (rDNA) son secuencias altamente variables, de gran importancia para distinguir especies de hongos, mediante análisis de PCR (Martin and Rygiewicz, 2005).

El ribosoma eucariota funcional está compuesto por dos subunidades. La subunidad pequeña contiene una molécula de 18S rRNA (SSU) y la subunidad grande contiene una molécula 5.8S y una de 28S rRNA (LSU). Los genes que codifican para 18S, 5.8S y 28S rRNA se encuentran en el operon ribosomal, que tienen más de una copia que se repite en tándem (rDNA) (Weider et al., 2005). En cada unidad, los genes son separados por dos espacios transcritos internos (ITS1 y ITS2), y dos unidades de rDNA separadas por espacios intergénicos (IGS) (Edel, 1998).

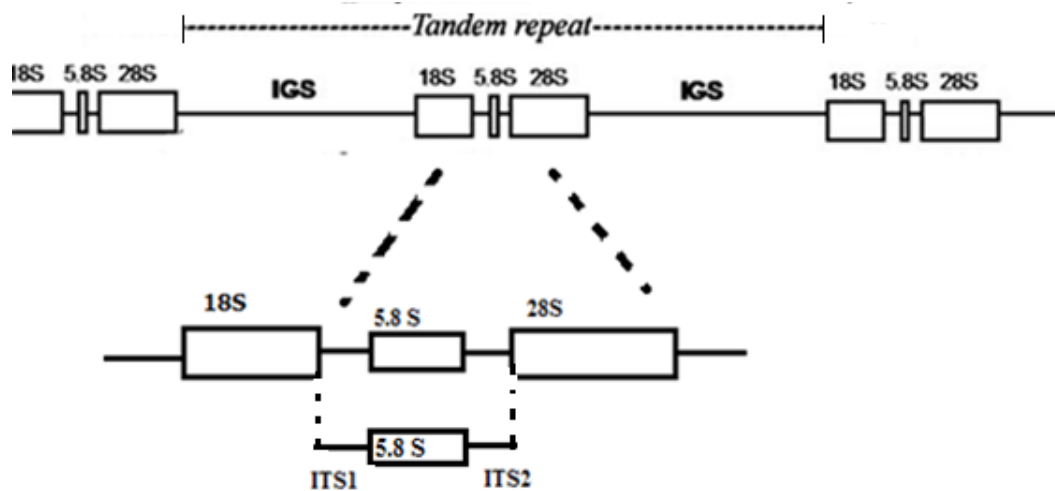


Figura 2. Diagrama de la estructura básica de los genes rRNA que codifican para eucariotas basado en Weider et al. (2005); modificado a partir de Sterner and Elser (2002).

Con el rápido desarrollo de las técnicas moleculares, especialmente la PCR y el diseño de iniciadores, para la amplificación de diversas regiones del rDNA hizo más factible el estudio de los hongos (Lu et al., 2002). Uno de los primeros estudios por White et al. (1990) amplificando y secuenciando directamente el rDNA permitieron determinar las relaciones filogenéticas en hongos (Edel, 1998).

El locus más utilizado para los estudios micológicos basados en DNA, a nivel de especies es el espacio transcrito interno (ITS) del DNA ribosomal, su tamaño es aproximadamente de 550 a 600 pares de bases (bp) y es multicopia. El segmento combina ciertas ventajas de resolución a diversas escalas; ITS1: rápida evolución, 5.8S es muy conservado, ITS2: la evolución es moderadamente rápida a rápida (Nilsson et al., 2008). Varias características hacen que la región ITS pueda ser utilizado: (a) En hongos y

oomycetes. Puede ser amplificado con iniciadores universales. (b) La naturaleza de multicopia del rDNA permite que la región ITS sea fácil de amplificar con pequeñas cantidades de DNA y obtener un producto cuya variabilidad típicamente refleja sinapomorfías a nivel de especie (Mehmann et al., 1994). Esta región muestra un alto grado de polimorfismo entre especies, pero se cree que está altamente conservada dentro de las especies, por lo tanto es un valioso marcador genético para la identificación de especies (Karen et al., 1997).

El gen 28S rRNA a veces discrimina especies por si solo o combinado con ITS, aunque se han usado juntos en muy pocos estudios. El gen 18S rRNA se utiliza comúnmente en filogenia, aunque tiene menos dominios hipervariables en los hongos que su homólogo 16S rRNA en bacterias (Schoch et al., 2012) y la región codificante 5.8S es muy poco usada para filogenia debido a su alto grado de conservación, tomando en cuenta su pequeño tamaño (164-165 bp) que se traduce en poca variación informativa respecto a las regiones más utilizadas (Hershkovitz and Lewis, 1996).

Los primeros iniciadores usados para la amplificación de la región ITS en hongos, fueron “ITS1” e “ITS4”, que amplifican la región ITS1, ITS2, este set de iniciadores permiten amplificar una amplia gama de hongos de aislamientos individuales, pero cuando se hacen estudios de asociación planta-microbiota no excluye efectivamente las secuencias de la planta hospedante (Martin and Rygielwicz, 2005). Posteriormente se empezaron a utilizar los iniciadores ITS1-F e ITS4-B, que excluyen el DNA la planta hospedante, y amplifican eficientemente a todos los basidiomicetos, discriminando DNA de ascomycetos (Gardes and Bruns, 1993).

Posteriormente se diseñaron dos pares de iniciadores para amplificar genes rRNA (rDNA) de los cuatro principales phyla de hongos: Ascomycota, Basidiomycota, y Zygomycota, los iniciadores se nombraron SSU-0817-59, nu-SSU-1196-39, y nu-SSU-1536-39, que amplifican regiones del 18S (Borneman and Hartin, 2000).

Cuadro 1. Relación de iniciadores para la amplificación del Espacio Transcrito Interno (ITS) del rDNA en eucariotas. Vilgalys lab, Duke University¹¹

Nombre del iniciador	Secuencia (5'→3')	Referencia
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White et al, 1990
ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	White et al, 1990
ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC	White et al, 1990
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White et al, 1990
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	White et al, 1990
ITS1-F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	Gardes and Bruns, 1993
ITS4-B	CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG	Gardes and Bruns, 1993
5.8S	CGCTGCGTTCTTCATCG	Vilgalys lab
5.8SR	TCGATGAAGAACGCAGCG	Vilgalys lab
SR6R	AAGWAAAAGTCGTAACAAGG	Vilgalys lab

¹¹ Conserved primer sequences for PCR amplification and sequencing from nuclear ribosomal RNA. Vilgalys lab, Duke University. [http://biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm#Internal transcribed spacer \(ITS\) region primers](http://biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm#Internal%20transcribed%20spacer%20(ITS)region%20primers) (Accesado diciembre,2013)

2.5.3 Uso de la Técnica de Multilocus (MLST)

Multilocus Sequence Typing es un procedimiento desarrollado en 1998 para identificar cepas bacterianas (Maiden, 2006), está basado en diferencias de la secuencia de nucleótidos en un número pequeño de genes *housekeeping*. En este sistema cada alelo de un gen recibe un número, y cada cepa caracterizada (para $n=loci$) es representado por un conjunto de n números definiendo los alelos de cada locus (Narayanasamy, 2008). Una diferencia de un solo nucleótido, produce siempre un nuevo alelo en un conjunto de datos de MLST (Peacock et al., 2002).

El desarrollo de MLST representa un avance importante, ya que relaciona secuencias de nucleótidos de fragmentos conservados de genes *housekeeping* de organismos (Peacock et al., 2002), para la caracterización, subtipificación y clasificación de los miembros de una población. Los genes *housekeeping* son utilizados debido a que son esenciales para la función de la célula, por lo tanto están presentes en todos los organismos y las variaciones en su secuencia de nucleótidos se dan lentamente y es probable que sean de manera selectiva (Saunders and Holmes, 2007). Generalmente se utilizan siete genes *housekeeping* para la caracterización inequívoca, las regiones secuenciadas de los genes son de un tamaño aproximado de 450-500 bp y las regiones que se encuentran dentro de una única especie se les asigna un número de alelos, cada cepa se caracteriza entonces por los alelos en cada uno de los siete loci, que constituyen su perfil alélico o secuencia tipo (ST) (Pérez-Losada et al., 2013).

Los niveles de polimorfismo genético en los genes *housekeeping* suelen ser lo suficientemente alto como para evaluar la estructura de la población y la relación de la

cepa, sin embargo es necesario inferir con precisión las relaciones evolutivas intra e inter especies, al igual que la correlación de la función del gen y la resolución filogenética (Cooper and Feil, 2006).

Esta técnica combina varias ventajas (i) tipificación basada en el método de secuenciación, que proporciona datos inequívocos, fácilmente comparables entre diferentes laboratorios, permitiendo la elaboración de bases de datos. (ii) un enfoque filogenético para la diversidad genética, se basa en el polimorfismo de secuencias de genes *housekeeping* además de la presión selectiva. Se puede desarrollar análisis multilocus para genes asociados a virulencia (Lemée and Pons, 2009).

Lamentablemente el proceso de selección de genes no es universal, es decir, este proceso debe ser realizado para cada microorganismo de forma individual, por lo tanto el método es de aplicación universal, pero su desarrollo no. El proceso de desarrollo es lento y laborioso, y esto puede limitar la aplicación a especies en las que ya ha sido desarrollado (Vázquez y Berrón, 2004).

En estudios de MLST, varios genes *housekeeping* (más de cinco) son analizados y se establecen las relaciones entre los taxones; sin embargo la utilidad de esta técnica para describir especies bacterianas tiene que ser demostrado para cada uno de los taxones o grupos de especies estudiados y para los genes seleccionados. Esta técnica ha sido aplicada a diferentes taxones bacterianos (Pascual et al., 2010).

Los géneros bacterianos en los que principalmente se ha desarrollado esta técnica son: i *Lactobacillus* y *Enterococcus* (Naser et al., 2006), ii *Borrelia* (Richter et al., 2006), iii *Mycobacterium* (Mignard and Flandrois, 2008) y iv *Pseudomonas* y relacionados (Yamamoto et al., 2000).

Cuadro 2. Relación de iniciadores para la amplificación de genes del género de *Pseudomonas* y sus relacionados.

Gen	Secuencia (5'->3')	Referencia
<i>atpD f</i>	PfatpD GACGTCGAATCCCTCARGA PfatpD2 GACGTCGAGTTCCKCARGA	Young and Park, 2007
<i>atp D r</i>	PratpD TSGCTTTTTCCACAGCTTCT PratpD2 TTGGCTTTTTCCACKACTTC	Young and Park, 2007
<i>car A</i>	PfcarA AGCGCTATTGGTTCTSGAAG PrcarA CCTGGAAGCTGAACGCYGSTT	Young and Park, 2007
<i>rec A</i>	ErecAF GARKCBTCNGGTAAAACVAC ErecAR TTCGCYTTRCCCTGRCCRATC ErecAR2 RTTGATRCC TTCGCGTASA	Young and Park, 2007
<i>gyrB</i>	CAGGAAACAGCTATGACCAYGSNGGNGGNAARTTYRA TGTA AACGACGGCCAGTGCNNGRTCYTTYTCYTGRCA	Yamamoto et al., 2000
<i>rpoD</i>	70F- ACGACTGACCCGGTACGCATGTAYATGMNGARATGGGN ACNGT 70R- ATAGAAATAACCAGACGTAAGTINGCYTCNACCATYTCY TTYTT	Yamamoto et al., 2000

En hongos unos de los primeros objetivos de la técnica de MLST fue para el reconocimiento de especies, debido a que los métodos tradicionales de identificación (fenotipo), no brindaban información suficiente sobre si el hongo es exclusivamente clonal, o si también se recombina (Taylor and Fisher, 2003).

Los primeros estudios en hongos usando esta técnica fue en poblaciones de hongos patógenos de humanos como: *Candida tropicalis*, *C. krusei*, *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, *C. neoformans* var. *grubii*, *Histoplasma capsulatum*, y *Coccidioides immitis* (Bain et al., 2007). También fue empleada para algunos hongos fitopatógenos como *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Taylor and Fisher, 2003).

El análisis de múltiples loci puede proveer mayor resolución, por lo tanto los estudios filogenéticos de hongos con hipótesis filogenéticas son más confiables (Begerow et al., 2004).

Las secuencias de genes de rRNA son las más utilizadas extensivamente para inferencias filogenéticas. Por otro lado, las filogenias basadas en genes que codifican para proteínas, en ocasiones, se ha encontrado que puede haber inconsistencia con las filogenias basadas en genes de rRNA (Hasegawa and Hashimoto, 1993). Obviamente todas las filogenias basadas en un solo gen, no solo se somete a errores estadísticos, sino también a la alineación utilizada, a la tasa de evolución,

La elección de los genes con valor potencial para MLST puede ser hecho fácilmente cuando la información genómica completa está disponible para ayudar a localizar posibles SNPs; en ausencia de la información genómica se puede utilizar iniciadores diseñados de regiones conservadas de genes *housekeeping* (Odds and Jacobsen, 2008). Los genes

housekeeping codifican para proteínas, y en ellos se acumulan menos mutaciones y son menos variables (Einax and Voigt, 2002). Por lo tanto, son útiles para estudios de evolución (Hightower and Meagher, 1986), basados en la premisa, de que entre mayor número de caracteres conservados, son más confiables para la detección de las relaciones filogenéticas (Daniel et al., 2001). Entre los genes más utilizados para filogenia de hongos son:

Tubulina: Las proteínas de tubulina desempeñan un papel crucial en los procesos celulares de eucariotas. Como subunidades elementales de los microtúbulos, ellos representan los principales componentes del citoesqueleto (incluyendo husos mitóticos) y flagelos eucariotas.

Los microtúbulos proporcionan la base molecular para la división celular, la generación y el mantenimiento de la forma celular, el transporte intracelular, y la motilidad celular mediante el movimiento flagelar-ciliar (Einax and Voigt, 2002).

Las tubulinas constituyen una familia de proteínas que implican: α (alpha)-, β (beta)-, γ (gamma)-, δ (delta)-, ϵ (epsilon)-, ζ (zeta)- and η (eta)-tubulinas (McKean et al., 2001). De las siete variedades, α y β tubulina son las más abundantes en las células eucariotas, debido a que sus heterodímeros son los constituyentes primarios de los microtúbulos (Oakley 2000, McKean et al. 2001).

Como todas las células eucariotas contienen microtúbulos, las proteínas de tubulina probablemente se originaron cuando los primeros eucariotas evolucionaron, hace aproximadamente 1.600 millones de años (Wang et al., 1999).

Los genes de tubulina, especialmente de β -tubulina están recibiendo más atención en la investigación de relaciones evolutivas en todos los niveles: (i) análisis filogenéticos a nivel de reino y (ii) en estudios de grupos de especies dentro animales, hongos y plantas (Edgcomb et al. 2001). El gen de β -tubulina se encuentra de manera fiable en todos los eucariotas, lo que hace que este gen sea adecuado para análisis filogenéticos, especialmente para la estimación de filogenias a nivel profundo (Einax and Voigt, 2002).

La inclusión de los organismos en análisis filogenéticos depende de una amplificación confiable del gen β -tubulina. Se enlista pares de iniciadores que facilitan la amplificación por PCR del gen β -tubulina de una amplia gama de organismos, con especial énfasis en hongos.

Cuadro 3. Iniciadores universales de β -tubulina y gama de organismos. Los iniciadores con las letras iniciales de F por hongos, A para los animales, y P para plantas; la letra r denota los iniciadores inversos.

Nombre del primer	Especificidad del iniciador	Secuencia (5' - 3')
F- β tub1	Hongos	CARGCYGGTCAR* TGY* GGTAACCA
A- β tub1	Animal	CARGCYGGK CARTGYGGBAACCA
P- β tub1	Planta	CARGGCGGCCARTGYGGBAACCA
F- β tub3	Hongo	TGGGCYAAGGGTY* AYTAYAC
A- β tub3	Animal	TGGGCYAARGGACAYTAYAC
P- β tub3	Planta	TGGGCCAAGGGICACTAYAC
F- β tub2r	Hongo	GGRATCCAYTCRACRAA
A- β tub2r	Animal	GGRATCCAYTCRACGAA
P- β tub2r	Planta	GGGATCCAYTCMACRAA

F-βtub4r	Hongo	GCCTCAGTRAA*YTCCATYTCRTCCAT
A-βtub4r	Animal	GCYTCYGYRAAYTCCAGYTCVTCCAT
P-βtub4r	Planta	GCCTCRGTGAACTCCATCTCGTCCAT

Los asteriscos * indican posiciones de intrón en hongos.

Actina: Es uno de los principales componentes del citoesqueleto de todas las células eucariotas. Esta proteína es uno de los mayores componentes de los microfilamentos, y juega un papel crucial en procesos celulares primarios (Pollard and Cooper, 1986) como transporte intracelular, endocitosis, exocitosis, condensación cromasomal y mitosis (Hightower and Meagher, 1986). Aparentemente estas funciones de actina no han permitido a diferentes especies de una amplia gama de phyla a divergir de manera significativa; es una de las proteínas más altamente conservadas. Esta característica hace que el gen de actina sea útil para análisis filogenéticos (Wery et al., 1996), auxiliando en la corroboración de los resultados basados en rDNA y otros genes que codifiquen para proteínas.

Varios genes de actina son expresados en una variedad de organismos, incluyendo los hongos; sin embargo, en *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus nidulans* y *Phytophthora megasperma* solo un gen que codifica para actina ha sido reportado (Unkles et al., 1991).

Cuadro 4. Iniciadores para amplificación del gen actina en ascomicetos

Gen	Iniciadores	Secuencia (5´-3´)	Referencia
Actina	ACT-512F	ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC	Carbone, 1999
	ACT-783R	TACGAGTCCTTCTGGCCCAT	

Un aspecto interesante de los genes de actina obtenidos de una variedad de células eucariotas, es la variación en el número y ubicación de los intrones. Estudios sobre la estructura del gen de actina sugieren que los genes más antiguos de actina se dividieron en intrones. Las ubicaciones y variabilidad en intrones encontradas en genes contemporáneos, puede ser el resultado de la delección de diferentes intrones durante la evolución de los diferentes phyla (Matheucci et al., 1995). Se sugiere, que las posiciones de intrones en los hongos pudieron haber conservado algunas características de un gen putativo ancestral, que no había sido conservado en otros organismos multicelulares examinados (Wildeman, 1988).

Con el incremento de la disponibilidad de secuencias que codifican para proteínas, en las bases de datos (GenBank y otras); fue posible el diseño de iniciadores que pudieran amplificar el gen de actina para muchas especies de hongos (ascomicetos) (Carbone and Kohn, 1999).

Factor de elongación 1α : El gen TEF codifica para el factor de elongación 1α , el cual es un importante componente del proceso de síntesis de proteínas en eucariotas y archae (van 't Klooster et al., 2000). Promueve la unión de GTP- dependiente de la aminoacil-tRNA al ribosoma, y participa en la corrección codón-anticodón (Song et al., 1989). Recientes hallazgos sugieren, que *tef 1 α* puede tener funciones adicionales más allá de su convencional papel en el alargamiento del polipéptido; por ejemplo (i) Parece tener una

gran afinidad para la unión de polímeros de actina y tubulina. (ii) Puede jugar un papel en la regulación del citoesqueleto de actina (van 't Klooster et al., 2000). El *tef-1 α* está compuesto por 1647 bp con tres intrones (Kitamoto et al., 1998).

Debido a su presencia universal, y su lento ritmo de evolución, es adecuado para la determinación de relaciones filogenéticas (Baldauf and Doolittle, 1997). Proporciona una buena resolución a nivel de especie para muchos grupos de hongos (Lewis et al., 2011). Se ha demostrado, que la filogenia obtenida con factor de elongación 1α , es congruente con otras filogenias en la recuperación de la monofilia de grupos tales como: Metazoa, Hongos, Magnoliophyta y Euglenozoa (Knutsen et al., 2004).

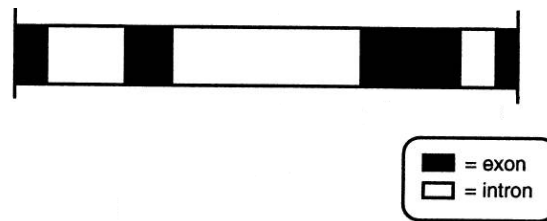


Figura 3. Mapa de la región del gen *tef-1α*, mostrando intrones y exones. O'Donnell et al. (1998).

Estudios que comparan marcadores filogenéticos en *Fusarium* han demostrado que el gen *EF -1α* posee considerablemente más información filogenética que mtSSU r DNA (O'Donnell et al., 1998).

Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa: Es una enzima clave en glicólisis y glucogénesis. El análisis molecular de genes que codifican para gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (*gdp*), en una larga variedad de organismos procariotes y eucariotas, reveló una fuerte conservación estructural

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Obtención de material vegetal

Se obtuvieron plántulas *in vitro* de 1 mes y plantas de 5 meses de edad de *Vaccinium* sp. var. *Biloxy* de uno de los viveros de importancia en las regiones productoras de arándano en Michoacán y Jalisco.

3.2 Aislamiento de microorganismos cultivados

De un vivero comercial de Michoacán, se obtuvieron plantas de 5 meses de edad. Los tejidos sintomáticos se lavaron con agua destilada y a partir de estos se seleccionaron pequeñas porciones de tejido sano y con presencia de pequeñas manchas necróticas en (a) Hojas y tallos: considerando la parte superior, media e inferior de la planta, y (b) de raíces, cortando pequeñas secciones de 0.3 cm² las cuales se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 1% por 1 min. Finalmente se enjuagaron con agua destilada estéril.

Las porciones de tejido seleccionadas para el aislamiento de hongos se secaron en papel estéril y se colocaron en cajas de Petri conteniendo medio PDA (Papa Dextrosa Agar) (4 g infusión de papa, 20 g Dextrosa y 15 g Agar). Para el aislamiento de bacterias, dos porciones de tejido con síntomas similares se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL con 200 µL de agua destilada estéril, se dejaron a 4 °C por 24 h para posteriormente hacer un estriado en medio B de King (BK) (10 g de Proteosa peptona, 1.5 g de K₂HPO₄, 1.5 g de MgSO₄, 15 mL de glicerol y 1000 mL de Agua).

Además de las plantas obtenidas de vivero, también se obtuvieron plantas en tubos de cultivo *in vitro*, de las cuales se seleccionaron pequeñas porciones de tejido de tallo considerando la parte baja, media y superior. Se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 1% por 1 min. Finalmente se enjuagaron con agua destilada estéril. La siembra del tejido se realizó siguiendo el procedimiento anteriormente descrito para el tejido proveniente de plantas almacigo.

Posteriormente se procedió a transferir las colonias de hongos y bacterias que se desarrollaron a nuevas cajas con medio PDA y medio BK para obtener cultivos puros.

3.3 Análisis molecular

3.3.1 Extracción de DNA

3.3.1.1 Hongos

Se colocaron en tubos Eppendorf de 200 μ L conteniendo 30 μ L de solución de lisis (desarrollada por el Laboratorio de Biotecnología y Patología de Semillas) una porción aproximada de 5 mm de micelio. Los tubos se mantuvieron a 95 °C durante 5 min, después se centrifugaron por 10 min a 5000 xg.

3.3.1.2 Procariotes

Con una punta para pipeta se tomó una pequeña porción de colonias puras y se colocó en tubos Eppendorf de 200 μ L conteniendo 30 μ L de solución de lisis (desarrollada por el Laboratorio de Biotecnología y Patología de Semillas). Los tubos se mantuvieron a 95 °C durante 5 min, después se centrifugaron por 10 min a 5000 xg.

Posteriormente se tomaron 5 μ L del sobrenadante para la amplificación de los genes ribosomales y *housekeeping* de hongos y bacterias mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

3.3.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

3.3.2.1 Amplificación del Espacio Transcrito Interno (ITS): Identificación filogenética de Hongos y Oomycetes

Para la amplificación del *loci* ribosomal de la región correspondiente al Espacio Transcrito Interno (ITS) del rDNA se utilizaron los siguientes iniciadores universales ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al.,1990) que amplifica un fragmento de 580 pares de bases (bp) aproximadamente. La mezcla de reacción de PCR se preparó en un volumen final de 25 μ L conteniendo 13.1 μ L de agua ultrapura esterilizada, 5 μ L of 5 \times PCR buffer (con 20 mM MgCl₂), 1 μ L of dNTPs (de cada uno 20 μ M), 0.3 μ L de cada iniciador (10 μ M), 5 μ L de DNA genómico (20 ng), y 0.3 μ L (2 U) de *GoTaq* DNA (Promega, USA).

La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador C1000 Touch (BIO-RAD, USA). Las condiciones de amplificación fue un ciclo inicial de desnaturalización de 4 min a 95 °C, seguido de 30 ciclos de 1min a 95 °C, 1 min a 58 °C y 2 min a 72 °C y un ciclo final de desnaturalización de 10 min a 72 °C.

3.3.2.2 Amplificación de la subunidad pequeña del ribosoma 16S rDNA: Identificación filogenética de (Bacterias):

Para la amplificación del gen 16S rRNA se utilizaron los siguientes iniciadores 8 F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') que corresponde a la posición 8 a 27 y 1492 R (5'-GGTTACCTTGTTACGACT T-3') (Eden et al., 1991) que es el complemento de las posiciones de 1510 a 1492. La mezcla de reacción de PCR se preparó en un volumen final de 25 µL conteniendo 13.1 µL de agua ultrapura, esterilizada 5 µL of 5× PCR buffer (con 20 mM MgCl₂), 1 µL of dNTPs (de cada uno 20 µM), 0.3 µL de cada iniciador (10 µM), 5 µL de DNA genómico (20 ng) y 0.3 µL (2 U) de *GoTaq* DNA (Promega, USA).

La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador C1000 Touch (BIO-RAD, USA). Las condiciones de amplificación fue un ciclo inicial de desnaturalización de 2 min a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 2 min a 95 °C, 1 min a 59 °C y 1 min 30 s a 72 °C y un ciclo final de desnaturalización de 5 min a 72 °C

3.3.2.3 Amplificación de genes *housekeeping* para hongos

Se amplificaron seis regiones de genes *housekeeping*. Actina (ACT) (316 bp), Quitin sintasa (CHS-1) (229 bp), Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (308 bp), Histona3 (HIS3) (430 bp), beta-tubulina (TUB2) (716 bp) y Factor de elongación 1 (TEF) (250 bp). Los iniciadores usados en este estudio se muestran en el siguiente cuadro:

Cuadro 5. Relación de iniciadores utilizados para la amplificación de genes *housekeeping* presentes en organismos eucariotas.

Gen	Iniciadores (5'->3')	Referencia
Actina	ACT-512F(5'-ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC-3') ACT-783R (5'-TACGAGTCCTTCTGGCCCAT-3')	Carbone and Kohn, 1999
Glyceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa	GDF1 (5'-GCCGTC AACGACCCCTTCATTGA-3') GDR1 (5'-GGGTGGAGTCGTA CTTGAGCATGT-3')	Guerber et al., 2003
Histona3	CYLH3F(5'-AGGTCCACT GGTGGCAAG-3') CYLH3R (5'-AGCTGGATGTCCTTGGAC TG-3')	Crous et al., 2004
Beta-Tubulina	T1 (5'-AAC ATG CGT GAG ATT GTA AGT-3') T2 (5'-TAG TGA CCC TTG GCC CAGT TG-3')	O'Donnell and Cigelnik, 1997
Factor de elongación 1 α	EF1-728F (5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3') EF1-986R (5'-TACTTGAAGGAACCCCTTACC-3')	Carbone and Kohn, 1999

La mezcla de reacción de PCR se preparó en un volumen final de 25 μ L conteniendo 13.1 μ L de agua ultrapura, esterilizada 5 μ L of 5 \times PCR buffer (con 20 mM MgCl₂), 1 μ L of dNTPs (de cada uno 20 μ M), .3 μ L de cada iniciador (10 μ M), 5 μ L de DNA genómico (20 ng) y 0.3 μ L (2 U) de *GoTaq* DNA (Promega, USA).

La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador C1000 Touch (BIO-RAD, USA). Las condiciones de amplificación para los genes de CHS-1, HIS3 y TUB2 fueron un ciclo inicial de desnaturalización de 5 min a 94 °C, seguido de 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 52 °C y 30 s a 72 °C, y un ciclo final de desnaturalización de 7 min a 72 °C. Para el gen

ACT las condiciones de amplificación un ciclo inicial de desnaturalización de 8 min a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 15 s a 95 °C, 20 s a 61 °C y 1 min a 72 °C, y un ciclo final de desnaturalización de 5 min a 72 °C y para el gen tef las condiciones de amplificación consistió en un ciclo inicial de desnaturalización de 1 min 25 s a 94 °C, seguido de 35 ciclos de 35 s a 95 °C, 55 s a 60 °C y 1 min 30 s a 72 °C, y un ciclo final de desnaturalización de 10 min a 72 °C.

3.3.3 Electroforesis horizontal en gel

Las amplificaciones se verificaron por electroforesis mediante un gel de agarosa al 1.5 % preparado con 1x TAE buffer (Tris Ácido acético glacial-EDTA). El gel se tiñó con el reactivo GelRed™ (3 mg L⁻¹) (Biotium, USA) y las bandas se visualizaron en un transiluminador X-PRESS con el software Infinity- VX2-3026 WL/LC/26M X-Press (Vilber Lourmat, Alemania).

3.3.4 Limpieza de producto de PCR

Los productos de PCR se purificaron mediante una reacción enzimática con ExoSAP-IT™ (Affymetrix, USA). Se mezclaron 5 µL del producto de PCR con 2 µL de ExoSAP, obteniendo un volumen final de 7 µL; para posteriormente incubarlo en un termociclador (BIORAD, MEX) a 37 °C por 15 min para que las enzimas de ExoSAP degraden el remanente de iniciadores y nucleótidos no utilizados en la reacción de PCR. Finalmente se inactivaron las enzimas de ExoSAP a 80 °C por 15 min.

3.3.5 Secuenciación Sanger

Para calcular la cantidad correcta del templado (producto de PCR) a usar en una reacción de secuenciación se realizó la cuantificación del producto de PCR purificado con un espectrofotómetro Nano Drop modelo 2000c (Thermo Scientific, USA).

Para cada una de las reacciones, se colocaron 18µL del buffer BigDye ®Terminator v3.1 (1X) (Applied Biosystems, USA) más 2 µL de cada una de las muestras en los pozos de la placa de secuenciación. Posteriormente se colocó la placa en el termociclador (Biorad, México) con el programa:

96 °C	1 min		25 Ciclos
96 °C	10 s		
50 °C	50 s		
60 °C	4 min		
4 °C	α		

Los productos de secuenciación se precipitaron con etanol/EDTA, y la placa se colocó en el Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems, USA).

3.3.6. Construcción de árboles filogenéticos

Las secuencias de ambas hebras se ensamblaron y editaron usando BioEdit versión 7.0.5 (Hall, 1999), con el cual se creó una secuencia consenso. Esta secuencia se compiló en un archivo fasta y se alineó con el *profile mode* del Clustal W 1.8.1 (Thompson et al.,

1994), incluido en el programa MEGA6 (Tamura et al., 2013). Estas secuencias, se compararon con las secuencias depositadas en el GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI), mediante la opción BLASTN.

La reconstrucción filogenética de hongos y bacterias aisladas a partir de *V. sp. var. Biloxy* se llevó a cabo de forma independiente para cada gen *housekeeping*. En todos los casos se empleó un modelo de 4x4 y el modelo de sustitución GTR con 10,000,000 de generaciones de cadenas ocultas de Markov de Montecarlo (MCMC), con un muestreo cada 1000 generaciones.

De cada una de las regiones consideradas se obtuvo información básica sobre los niveles de variación nucleotídica, (i) sitios conservados, (ii) sitios variables, (iii) sitios informativos en parsimonia y singletons, implementados en el programa MEGA6 (Tamura et al., 2013).

3.3.7 Análisis multilocus

Para los 29 aislamientos de hongos se amplificaron los siguientes genes *housekeeping* Actina (Act) (316 bp), Quitina sintasa (CHS-1) (229 bp), Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (308 bp), Histona3 (HIS3) (430 bp), beta-tubulina (TUB 2) (716 bp) y Factor de elongación 1 (tef) (250 bp). Posteriormente se secuenciaron y las secuencias obtenidas de ambas hebras se ensamblaron y editaron usando BioEdit versión 7.0.5 (Hall, 1999), con el cual se creó una secuencia consenso.

Los ocho genes *housekeeping* se analizaron con estadística Bayesiana, la combinación de los genes fue implementada en Mr Bayes v.3.1.2 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003).

IV. RESULTADOS

4.1 Aislamientos

De las plantas de *Vaccinium* sp. cv. *Biloxy* de 5 meses de edad producidas en vivero se obtuvieron porciones de tejido sano y con presencia de pequeñas manchas necróticas ubicadas en tallo (bajo, medio y alto), hojas (bajas, medias y altas) y raíz, cultivados en medio Papa Dextrosa Agar (PDA) y medio King B medium (BK), se obtuvieron 29 aislamientos de hongos y 28 aislamientos de bacterias.



Figura 4. (A) Planta de 5 meses de edad de *Vaccinium* sp. cv. *Biloxy*. (B) Tallo inferior mostrando parte de tejido sano y necrótico. (C) Tallo medio con tejido sano y necrótico.

(D) Tallo superior con tejido sano y necrótico. (E) Hojas de la parte alta, media y baja con tejido sano y necrótico y (F) Raíces.

De plantas en tubos de cultivo *in vitro*, se tomaron porciones de tallo (bajo, medio y alto) y fueron sembradas en medio PDA y medio BK, de esos aislamientos no se obtuvo algún crecimiento de hongo o bacteria.

4.2 Análisis molecular

4.2.1 Amplificación del Espacio Transcrito Interno (ITS)

Para los 26 aislamientos de hongos se realizó la extracción de DNA y se amplificó la región de ITS (Figura 5).

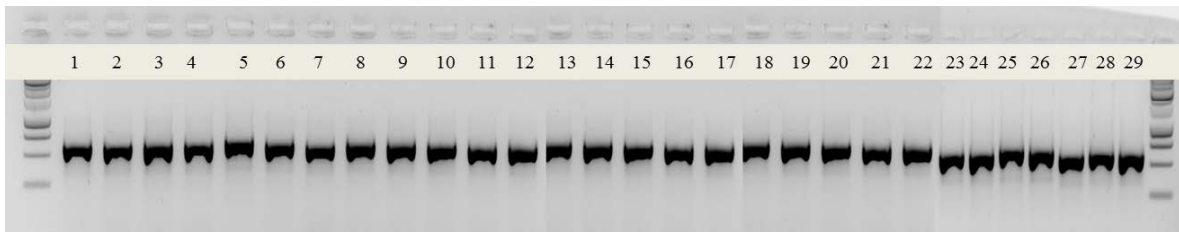


Figura 5. Amplificación por PCR del Espacio Transcrito Interno del rDNA de los 26 aislamientos de hongos obtenidos de *Vaccinium* sp. cv. *Biloxy*, con un tamaño de banda esperado de ~ 580 bp.

4.2.2 Amplificación de la subunidad pequeña del ribosoma 16S rDNA: Identificación filogenética de Procariontes (Bacterias)

Para los 28 aislamientos de bacterias se realizó extracción de DNA y se amplificó la región 16S rDNA (Figura 6).

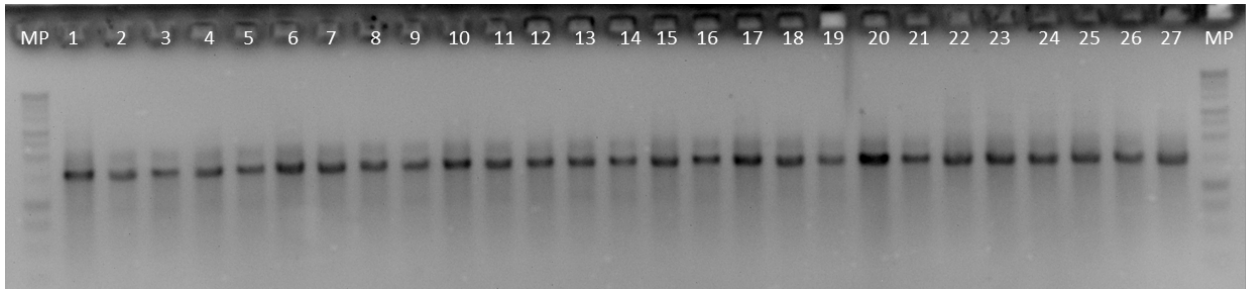


Figura 6. Amplificación por PCR de la subunidad pequeña del ribosoma 16S rDNA de los 28 aislamientos de bacterias obtenidos de *Vaccinium* sp. cv. *Biloxy*, con un tamaño de banda esperado de ~1500 bp. Muestras: DNA extraído de aislamientos de bacterias de: Tallo bajo 5, 7, 8, 12, 13, 15, 19, 21 y 24; Hoja baja 2, 4, 6, 14, 18 y 22; Hoja alta 3; Hoja media 11 y Raíz 1, 9, 10, 16, 20 y 25.

4.3 Amplificación de genes *housekeeping* para hongos

Para los 29 aislamientos de hongos se amplificaron genes *housekeeping* Actina, Quitin sintasa, Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, Histona 3, β -tubulina y Factor de elongación 1 α (Figura 7).

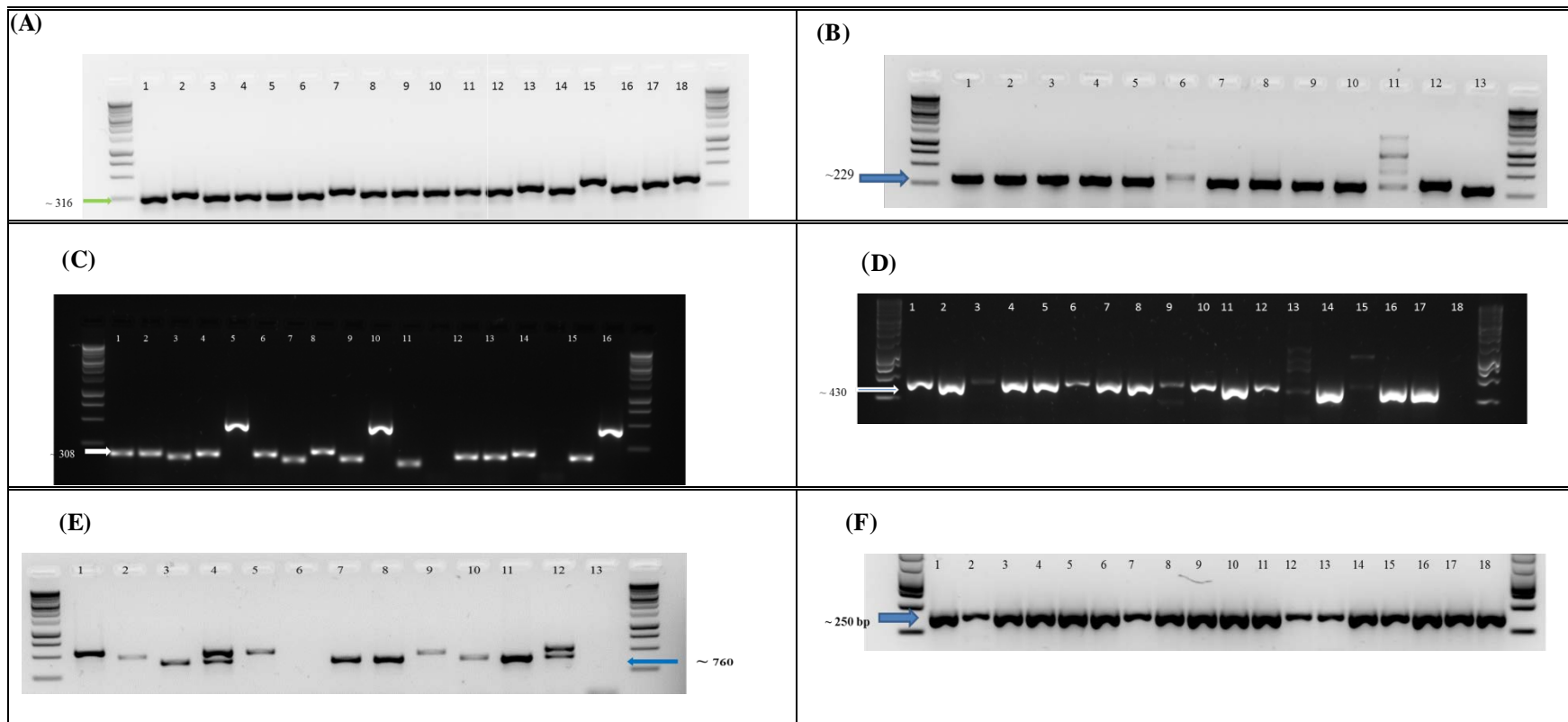


Figura 7. Amplificación por PCR de los genes multilocus (A) Actina, (B) Quitin Sintasa, (C) Gliceraldehido-3- fosfato, (D) Histona 3, (E) β - Tubulina y (F) Factor de elongación 1 α . De aislamientos de hongos obtenidos de plantas de *Vaccinium* sp. cv. *Biloxy* de 5

meses de edad sembradas en almacigo. Aislamientos de hongos de Tallo bajo 2-11,13, 15, Tallo medio 17 y 18; Raíz 12,14. Hoja baja 1.

Cuadro 6. Relación de aislamientos de hongos aislados de *Vaccinium sp. cv. Biloxy* amplificadas con cada uno de los genes *housekeeping* utilizados.

Aislamiento			Genes						
Identificación	Parte de la planta	ITS	Actina	Quintin sintasa	Glyceraldehido-3-fosfato	Histona 3	β -Tubulina	Factor de elongación 1	
9	<i>Alternaria sp.</i>	Tallo bajo	✓	✓		✓	✓	✓	✓
17	<i>Alternaria sp.</i>	Tallo medio	✓	✓			✓	✓	✓
18	<i>Alternaria sp.</i>	Hoja baja	✓	✓		✓	✓	✓	✓
21	<i>Alternaria sp.</i>	Raíz	✓	✓			✓	✓	✓
23	<i>Alternaria sp.</i>	Raíz	✓		✓	✓	✓	✓	✓
3	<i>Alternaria sp.</i>	Tallo bajo	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
1	<i>Alternaria sp.</i>	Hoja baja	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
25	<i>Alternaria sp.</i>	Raíz	✓			✓	✓	✓	
7	<i>Sporotrix varicecibatus</i>	Tallo bajo	✓	✓			✓		
4	<i>Alternaria sp.</i>	Tallo bajo	✓			✓			✓
5	<i>Alternaria sp.</i>	Tallo bajo	✓						✓
28	<i>Alternaria sp.</i>	Hoja baja	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
13	<i>Epicoccum nigrum</i>	Tallo bajo	✓	✓	✓		✓		
24	<i>Epicoccum sorghi</i> (=Phoma sorghina)	Tallo bajo	✓				✓		✓

29	<i>Epicoccum sorghi</i> (= <i>Phoma sorghina</i>)	Tallo bajo	✓		✓	✓		✓	✓
6	<i>Epicoccum sorghi</i> (= <i>Phoma sorghina</i>)	Tallo bajo	✓						✓
15	<i>Geomyces</i> sp.	Tallo bajo	✓						
12	Ophiostomataceae	Raíz	✓		✓		✓	✓	
19	Ophiostomataceae	Tallo medio	✓	✓	✓		✓	✓	✓
22	<i>Trichoderma asperellum</i>	Hoja alta	✓	✓					
8	<i>Hypocrea rufa</i>	Tallo bajo	✓		✓	✓			✓
14	<i>Hypocrea rufa</i>	Raíz	✓	✓					✓
11	<i>Fusarium</i> sp.	Tallo bajo		✓	✓			✓	✓

Árbol filogenético basado en ITS (Espacio Interno Transcrito)

El árbol filogenético se construyó con secuencias de 550 bp de longitud obtenidas de la amplificación de la región del ITS. Se formaron dos clados generales. En el clado I estuvo conformado por dos subclados. En el subclado uno se agrupó todas las especies del género *Alternaria*, no se observó diferenciación específica a nivel de especie, ya que no se encuentran delimitadas en ramas terminales. El subclado dos se agruparon a las especies pertenecientes al género *Epicoccum*, en este subclado se observa una delimitación a nivel de especie, ya que se puede observar dos grupos formados por *Epicoccum nigrum* y *Epicoccum sorghi*; cabe resaltar que los dos subclados que conforman el clado I, corresponden a la fase asexual de Ascomycetos. El clado II se divide en dos subclados, donde el subclado uno se encuentran especies correspondientes al género *Geomyces* y a la familia *Ophiostomataceae*, en este subclado se muestra que el conting H1 de un individuo perteneciente al género *Geomyces*, es idéntico a la especie tipo con número de accesoión en GenBank D270630, de igual forma se observa que los individuos pertenecientes a la familia *Ophiostomataceae* aislados de tallos se encuentra en una rama terminal y la especie tipo con número de accesoión en GenBank JQ272396 es diferente, ya que está en otra rama terminal. En el subclado dos, se agrupan individuos pertenecientes a los géneros *Hypocrea* y *Trichoderma*, en este caso los individuos aislados en el presente estudio se encuentran agrupados junto a las especies tipo de *H. rufa*, *T. asperellum*, *T. atroviridae* y *T. koningii* (= *Hypocrea koningii*, estado sexual) observándose una clara delimitación a nivel de especie (Figura 8).

4.4 Construcción de árboles filogenéticos

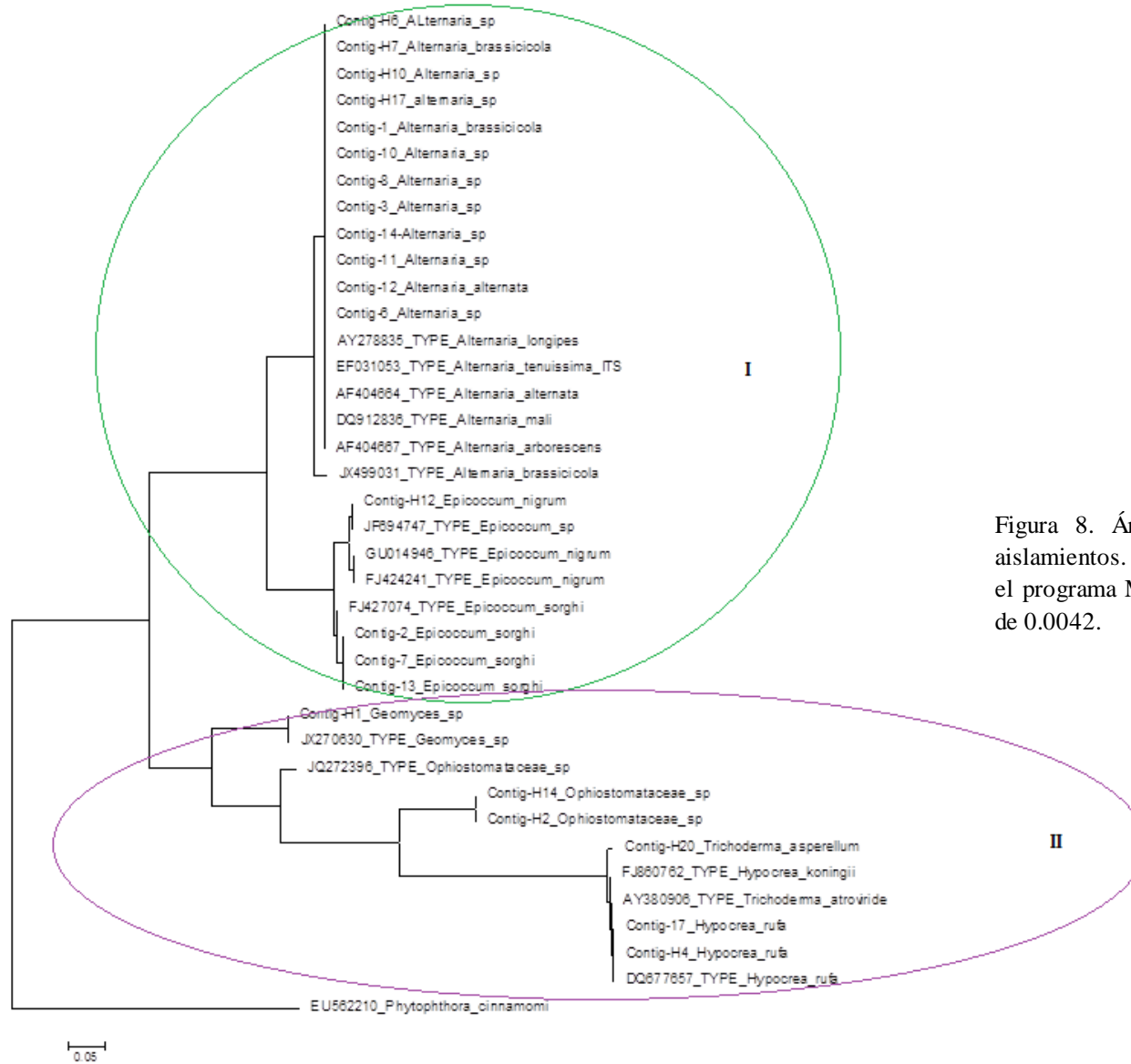


Figura 8. Árbol filogenético con inferencia bayesiana de 36 aislamientos. El árbol fue construido usando secuencias de ITS, con el programa Mr. BAYES. La desviación estándar final obtenida fue de 0.0042.

Árbol filogenético basado en el gen Beta-Tubulina

En el árbol filogenético construido con secuencias obtenidas de la amplificación del gen β -tubulina, con un tamaño aproximado de 350 bp, en algunas muestras las hebras obtenidas por la secuenciación no fueron buenas, por lo tanto no se procesaron. Se pueden observar dos clados generales. El clado I está conformado por dos subclados. En el subclado uno se encuentra todas las especies pertenecientes al género *Alternaria*, no observando una delimitación específica a nivel de especie. En el subclado dos se agrupan las especies pertenecientes al género *Epicoccum* y *Phoma*, en este subclado se observa una mejor delimitación a nivel de especie, ya que agrupan los aislamientos B2 y B7 junto a la especie tipo con el número de accesoión en Genbank FJ427174 *Phoma sorghina*, donde nos dice que los tres individuos pertenecen a la misma especie (*Phoma sorghina*); de igual forma nos agrupa en un clado a *Epicoccum nigrum* con *Epicoccum* sp., pero ambos se encuentran en una rama terminal del mismo clado.

En el clado tres se encuentran las especies pertenecientes al género *Fusarium* y *Sporothrix*; donde se observa una buena delimitación a nivel de especie, ya que concuerdan las ramas terminales con los individuos pertenecientes a cada especie, donde se observa la separación de género *Fusarium* y el género *Sporothrix*. El clado cuatro de acuerdo al árbol filogenético tiene una menor relación a los tres clados mencionados anteriormente, debido a que se une a ellos en el nodo principal, en este clado se encuentran dos individuos de la especie *Sporothrix variecibatus*, uno de los individuos pertenece a un aislamiento del presente estudio, y la especie tipo con el número de

accesión DQ821539, fue tomada como especie de referencia, lo cual habría que rectificar si la identificación molecular es correcta (Figura 9).

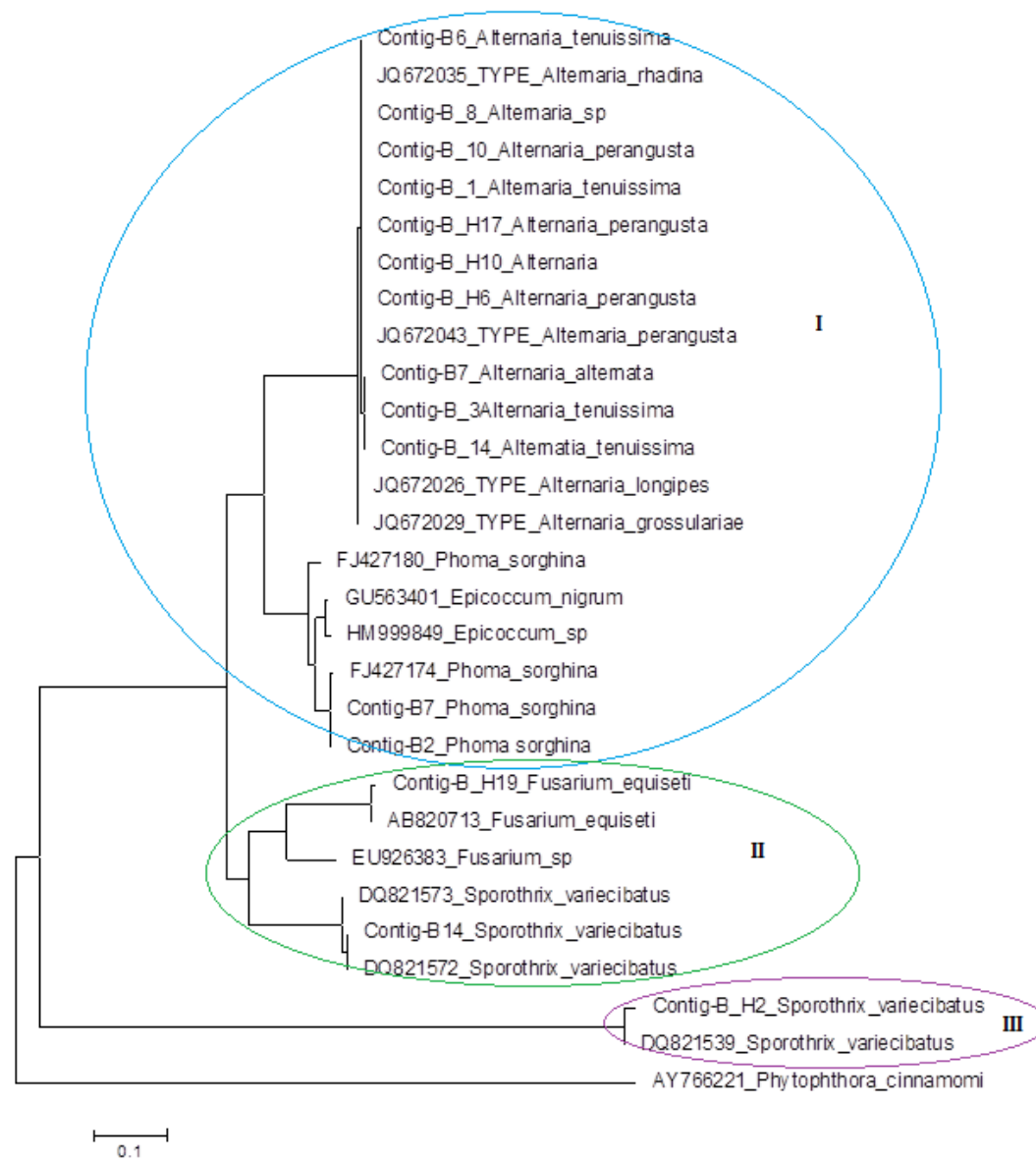


Figura 9. Árbol filogenético con inferencia bayesiana de 36 aislamientos. El árbol fue construido usando secuencias de β -TUB con el programa Mr. BAYES., la desviación estándar final obtenida fue de 0.005.

Árbol filogenético basado en el gen Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa

El árbol filogenético se construyó con secuencias de 150 bp aproximadamente de longitud, obtenidas de la amplificación del gen gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa. En algunas muestras las hebras obtenidas por la secuenciación no fueron buenas, por lo tanto no se procesaron. En este árbol filogenético se delimitan dos clados. En el clado uno se encuentran todas las especies pertenecientes al género *Alternaria*; este clado puede dividirse en dos subclados. En el subclado (a) están agrupados todos los individuos que no se sabe a qué especie de *Alternaria* corresponden. En el subclado (b) se encuentran agrupados todos los individuos pertenecientes a diferentes especies del género *Alternaria*, a excepción del conting G7 y la especie tipo JX960575, donde observamos que la especie tipo *Alternaria brassicicola* es la menos parecida a todas las demás especies de este género, ya que se encuentra en una rama terminal.

El clado dos se encuentra formado por dos individuos del género *Trichoderma*, donde probablemente el conting G sea una especie diferente a *Trichoderma atroviride*, ya que ambas especies se encuentran en una rama terminal (Figura 10).

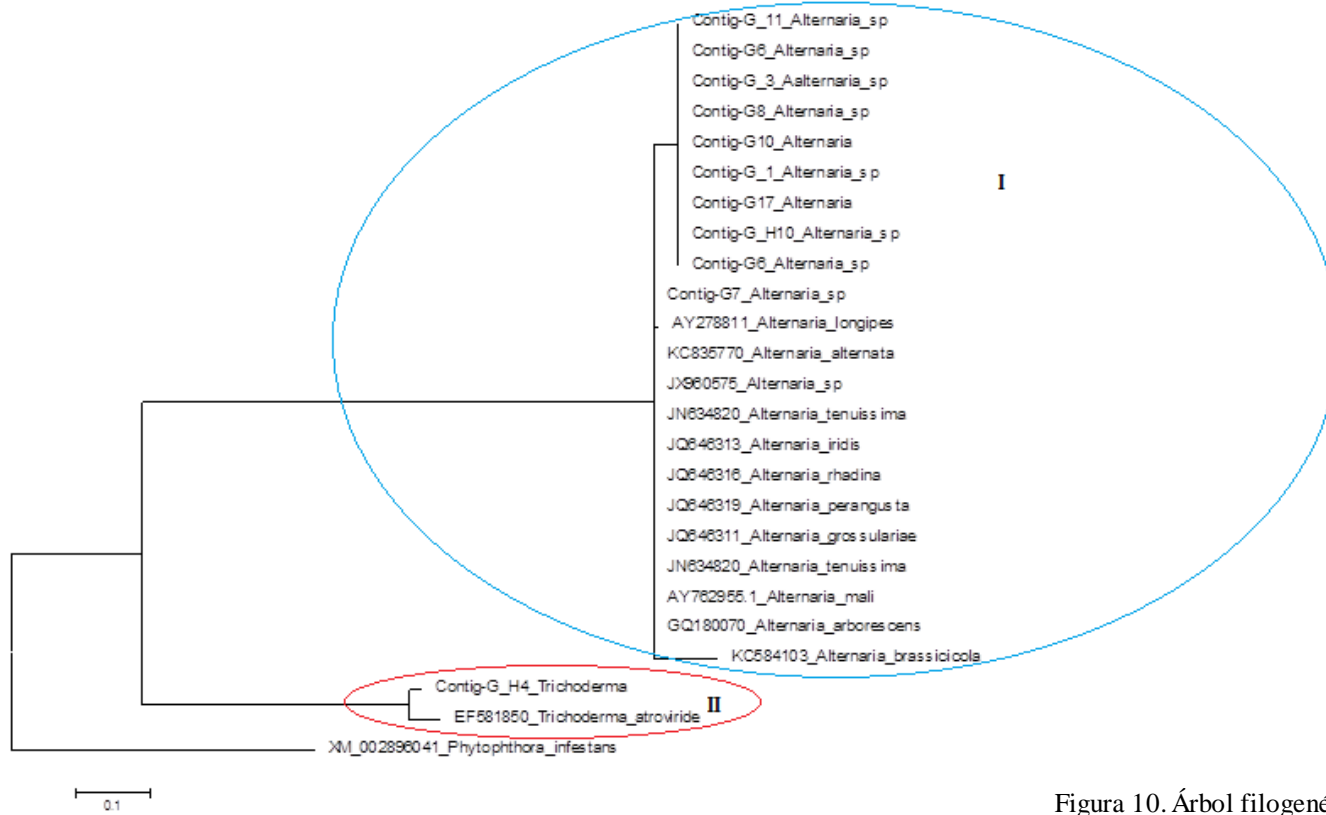


Figura 10. Árbol filogenético con inferencia bayesiana de 36 aislamientos. El árbol fue construido usando secuencias de Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, con el programa Mr. BAYES. la desviación estándar final obtenida fue de 0.005

Árbol filogenético basado en el gen Factor de elongación 1

El árbol filogenético se construyó con secuencias de 350 bp de longitud obtenidas de la amplificación del gen, en algunas muestras las hebras obtenidas por la secuenciación no fueron buenas, por lo tanto no se procesaron. En el árbol se generó un solo clado. En el clado I se puede observar cinco subclados. En el subclado uno se encuentran agrupados todos los individuos pertenecientes a las especies al género *Alternaria* y se observa que no hay una delimitación a nivel de especie, ya que todas están agrupadas en una misma rama. En el subclado dos se encuentran agrupados tres individuos del género *Pseudogymnoascus* (fase sexual del género *Geomyces*), identificado con ITS en el presente estudio, observando que en este subclado hay una buena delimitación a nivel de especie.

En el subclado tres se encuentran tres individuos de dos especies diferentes del género *Leptosphaerulina*. En el subclado cuatro se encuentran cuatro individuos del género *Cladosporium*, los cuales fueron aislados de tallos de *V. corymbosum* del presente estudio, donde probablemente se traten de dos especies diferentes de acuerdo a las ramas terminales.

En el subclado cinco se encuentran individuos de especies pertenecientes al género *Hypocrea* y *Fusarium*, donde también se muestra una buena delimitación a nivel de especie de ambos géneros; ya que *Fusarium equiseti* se encuentra en una rama terminal; tres individuos de la especie *Hypocrea rufa* se encuentran en una rama terminal, difiriendo de *Hypocrea koningii* (Figura 11).

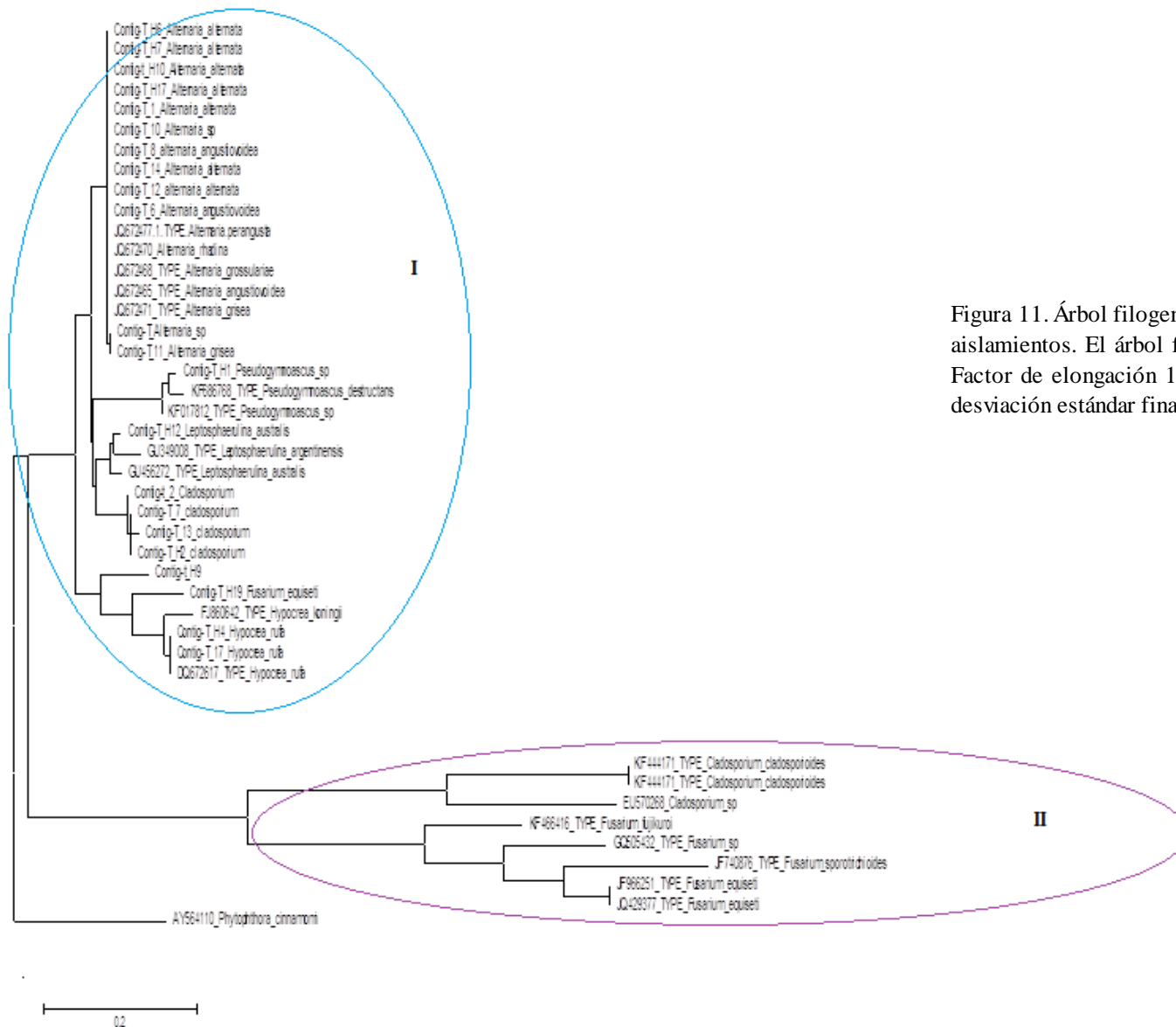


Figura 11. Árbol filogenético con inferencia bayesiana de 36 aislamientos. El árbol fue construido usando secuencias de Factor de elongación 1 α , con el programa Mr. BAYES. la desviación estándar final obtenida fue de 0.0068

Árbol filogenético basado en el gen Histona 3

El árbol filogenético se construyó con secuencias de 450 bp longitud, obtenidas de la amplificación del gen Histona 3. En algunas muestras las hebras obtenidas por la secuenciación no fueron buenas, por lo tanto no se procesaron. Se generaron dos clados, el clado I está dividido en dos subclados. En el subclado uno se encuentran agrupados todos los individuos pertenecientes a las diferentes especies encontradas del género *Alternaria*, donde se ve una clara delimitación de las especies. En el subclado dos se encuentran agrupados los individuos de las especies pertenecientes al género *Fusarium*, donde se observa que la especie de *Fusarium campotoceras* es la menos parecida entre los tres individuos de *Fusarium*.

En el clado tres se encuentran tres individuos pertenecientes a las especies del género *Cladosporium*, el cual tiene una buena delimitación de las especies, ya que cada una se encuentra en una rama terminal.

El clado II se divide en dos subclados. En el subclado uno, están agrupados dos individuos pertenecientes al género *Phoma* y *Cladosporium*, donde se observa una buena delimitación a nivel de género y especie. El subclado dos se encuentra conformado por dos individuos, un individuo perteneciente al género *Hypocrea* aislado en el presente estudio, ubicado en una rama terminal, lo que nos indica que se trata de una especie diferente a la especie tipo con número de accesión en GenBank AF520775 *Hypocrea jecorina* (Figura 12) .

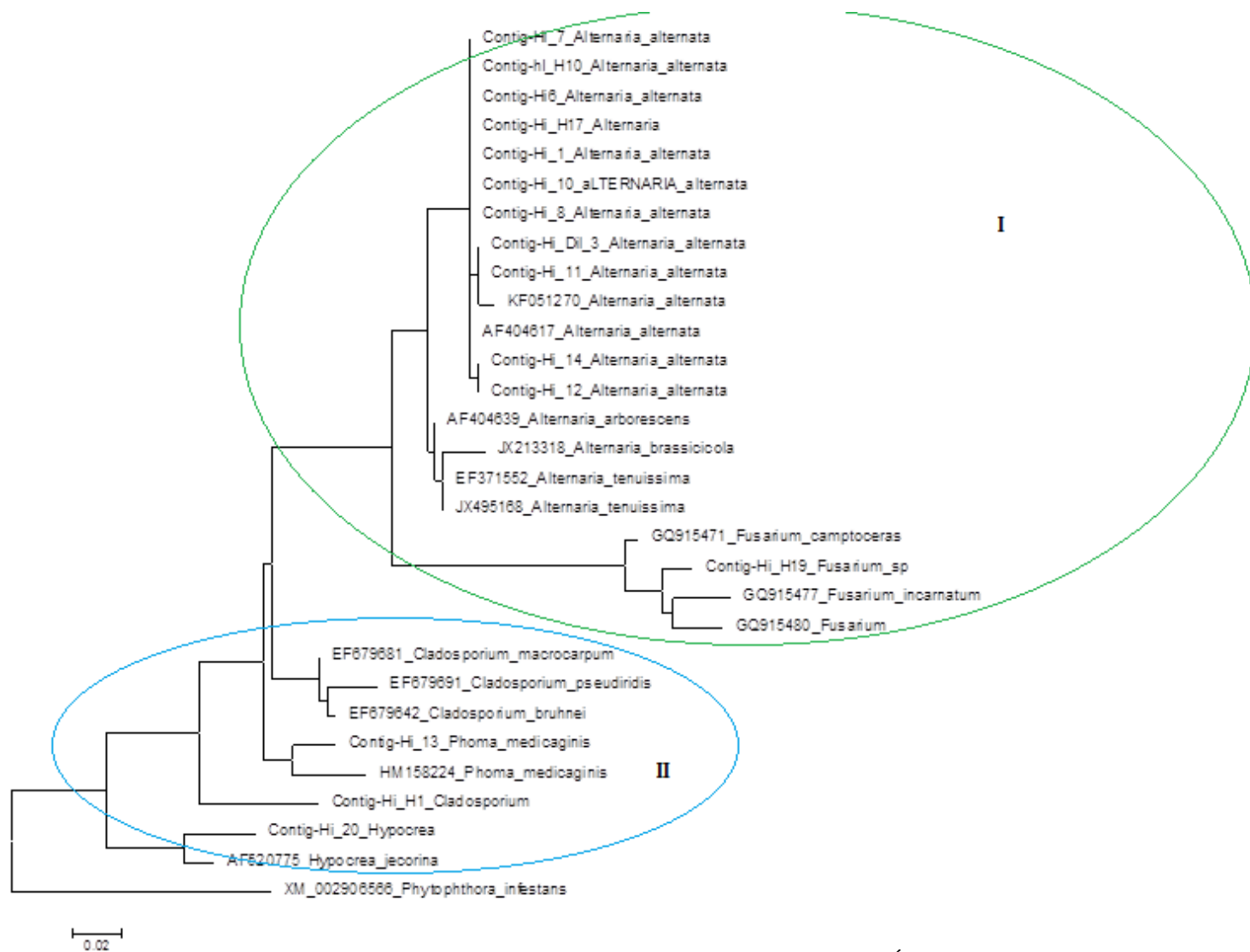


Figura 12. Árbol filogenético con inferencia bayesiana de 36 aislamientos. El árbol fue construido usando secuencias de Histona 3, con el programa Mr. BAYES. la desviación estándar final obtenida fue de 0.0040.

Multilocus

El árbol filogenético construido con el análisis multilocus, obtenido con base al Teorema de Bayes, se construyó con secuencias obtenidas de la amplificación de los genes de Beta-Tubulina, Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, Factor de elongación 1, Histona 3, Actina; y la región del Espacio Transcrito Interno. Se generó un árbol filogenético, en el que se pueden definir dos clados.

En el clado I, se observan dos subclados. En el subclado uno se agrupan las especies del género *Alternaria*. En el subclado dos están bien delimitados todos los individuos de las especies del género *Epicoccum*. En el clado II, se pueden observar tres subclados. En el subclado uno, se observa que el conting H1 aislado en el presente estudio de tallos de *Vaccinium sp. cv. Biloxy. corymbosum* perteneciente al género *Geomyces*, y la especie tipo con número de accesoión en GenBank JX270600, donde probablemente se trata de dos especies diferentes ya que cada una se encuentra en una rama terminal del subclado. El subclado dos se encuentran tres individuos del género Ophiostomataceae.

En el subclado tres se encuentran individuos de especies del género *Trichoderma* e *Hypocrea*, donde se observa una delimitación clara de las especies, ya que corresponden a cada rama terminal (Figura 13).

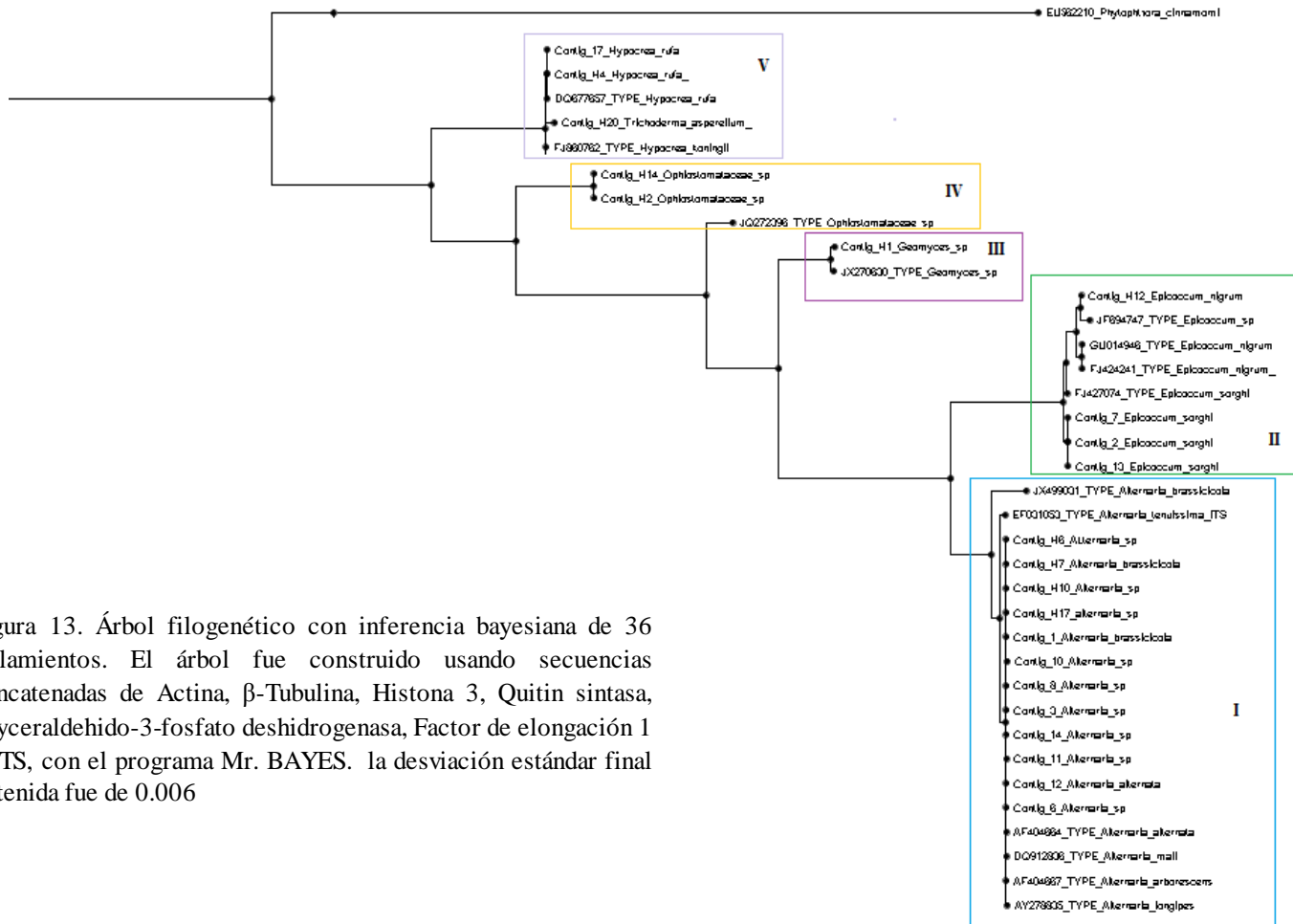


Figura 13. Árbol filogenético con inferencia bayesiana de 36 aislamientos. El árbol fue construido usando secuencias concatenadas de Actina, β -Tubulina, Histona 3, Quitin sintasa, Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, Factor de elongación 1 e ITS, con el programa Mr. BAYES. la desviación estándar final obtenida fue de 0.006

Árbol filogenético basado en el gen 16S rRNA

El árbol filogenético, se construyó con secuencias de 1500 bp, obtenidas de la amplificación del gen 16s rRNA. En algunas muestras las hebras obtenidas por la secuenciación no fueron buenas, por lo tanto no se procesaron. Se observan cuatro clados. El clado I, está dividido en dos subclados; donde se definen dos agrupamientos. En el agrupamiento uno se encuentran todos los individuos pertenecientes al género *Burkholderia*, y en el segundo agrupamiento se encuentran dos individuos pertenecientes al género *Delfia*, observando que podrían ser la misma especie, ya que ambos se encuentran en una rama terminal. En el subclado dos, se encuentran todos los individuos pertenecientes al género *Pantoea*, no observando una buena delimitación a nivel de especie en este agrupamiento.

En el clado II, se encuentran agrupados todos los individuos pertenecientes al género *Pseudomonas*, no observando una buena delimitación a nivel de especie. El clado III, se observan dos agrupamientos. El primer agrupamiento se encuentran individuos pertenecientes al género *Sphingomonas*, observando una buena delimitación en el agrupamiento a nivel de especie. En el agrupamiento número dos, se observan tres individuos pertenecientes al género *Novosphingobium*, observando una buena delimitación a nivel de especie. El clado IV, se observan dos agrupamientos. El agrupamiento uno se encuentran individuos pertenecientes al género *Leifsonia*, observando una buena delimitación a nivel de especie. En el segundo agrupamiento, se encuentran los organismos pertenecientes al género *Curtubacterium*, no observando una buena delimitación a nivel de especie (Figura 14)

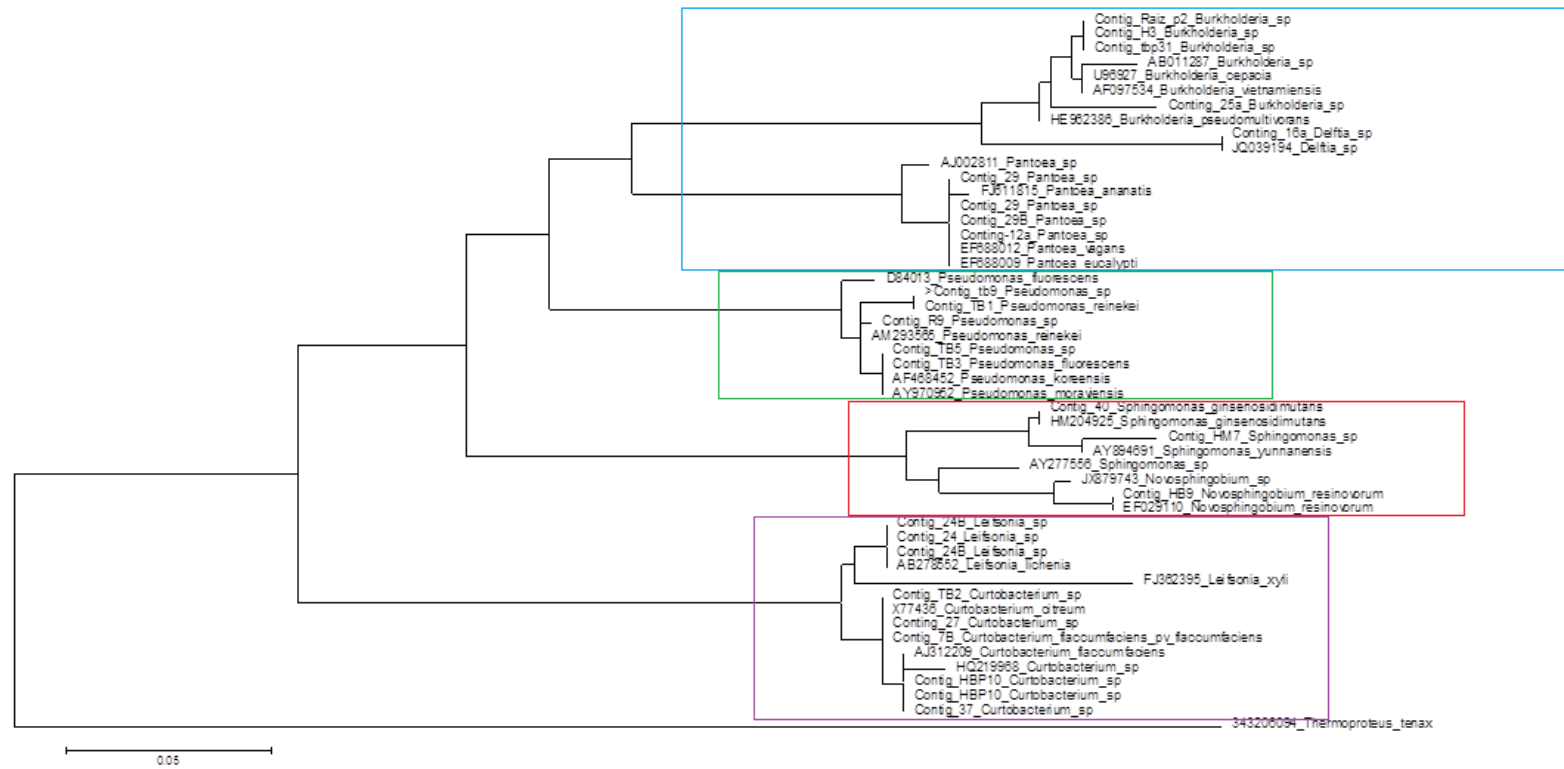


Figura 14. Árbol filogenético con inferencia bayesiana de 26 aislamientos de bacterias. El árbol fue construido usando secuencias del gen 16s rRNA, con el programa Mr. BAYES. la desviación estándar final obtenida fue de 0.004

De cada una de las regiones consideradas se obtuvo información básica sobre niveles de variación nucleotídica, (i) sitios conservados, (ii) sitios variables, (iii) sitios informativos en parsimonia y (iv) singletons, implementados en el programa MEGA 6 (Tamura et al. 2013).

Cuadro 7. Variación de los genes, Actina, Quitin sintasa, Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, Histona 3, β -Tubulina, Factor de elongación 1 α y Espacio Interno Transcrito en hongos aislados de *Vaccinium sp. cv. Biloxi*.

Regiones analizadas	Secuencias analizadas	Sitios obtenidos	Sitios analizados	Sitios conservados	Sitios variables	Sitios informativos	Singletones
Actina (ACT)	15	335	324	98	226	190	36
Quitin sintasa (CHS-1)	10	353	298	162	83	58	25
Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)	12	178	139	56	81	0	81
Histona3 (HIS3)	16	480	414	276	130	54	67
Beta-tubulina (TUB2)	15	405	354	92	249	103	142
Factor de elongación 1 (TEF)	22	369	309	224	82	50	32
Espacio Transcrito Interno (ITS)	21	609	559	279	280	254	26

Cuadro 8. Variación del gen 16S rRNA en bacterias aisladas de *Vaccinium sp.* cv Biloxy

Regiones analizadas	Secuencias analizadas	Sitios obtenidos	Sitios analizados	Sitios conservados	Sitios variables	Sitios informativos	Singletones
16S	26	1500	1408	708	596	460	89

V. DISCUSIÓN

El arándano junto con la fresa y zarzamora es una de las frutillas cuyo cultivo actualmente se está extendiendo en México, el cual se ve reflejado por el incremento anual de la superficie sembrada en el centro occidente del país (SIAP, 2013).

Considerando que el arándano es un cultivo de introducción, los sistemas de producción se han visto alterados por la presencia de enfermedades que reducen el rendimiento y la calidad de la frutilla para comercialización.

La producción de arándano inicia con la adaptación de plántulas *in vitro* en viveros. De las muestras obtenidas de plantas *in vitro* que se sembraron en medios de cultivo no se obtuvo algún crecimiento de hongo o bacteria, por lo que con base en los análisis realizados, se presume que las plantas *in vitro* obtenidas de este vivero podrían estar libres de microorganismos cultivables (hongos y bacterias). Caso contrario son las plantas derivadas de cultivo *in vitro*, y propagadas en almácigo, ya que de ellas si se obtuvieron hongos y bacterias. Por lo tanto un probable foco de contaminación sea en el momento del trasplante de la planta al sustrato para la aclimatación, o durante el desarrollo de la misma en las áreas de crecimiento o por el uso de sustratos contaminados.

Las especies de hongos identificadas en el presente estudio mediante aproximaciones filogenéticas y análisis bioinformáticos de 5 locus fueron: *Alternaria* spp., la cual fue reportada previamente causando enfermedad en *Vaccinium* sp. cv. *Biloxy*, observándose

síntomas en ramas y tallos al ser recién trasplantadas en campos comerciales (Wright et al., 2004). Los síntomas observados en tallos, coinciden con los reportados.

Epicoccum sorghi (= *Phoma sorghina*) y *Epicoccum nigrum*, estas dos especies fueron reportadas causando enfermedad en Estados Unidos de América (Massachusetts y Michigan). Al igual que *Cladosporium* sp., reportada en Massachusetts; las tres especies causando daño en tallos (Zuckerman, 1960; Weingartner and Klos, 1974). Al igual estas especies estuvieron presentes en aislamientos de tallos bajos y medios.

Otras especies de hongos encontradas, pero no reportadas causando enfermedad en *Vaccinium* sp. cv. Biloxy fueron: *Trichoderma* sp., *Geomyces* sp., *Leptosphaerulina* sp. y *Sporothrix variecibatus*.

Los cinco regiones moleculares seleccionadas en este estudio se amplificaron los 29 aislamientos de hongos aislados de *V. corymbosum*. De estos loci, ITS fue la región que presentó la más alta calidad en lectura y alineamiento de las secuencias, seguida por TEF y β - Tubulina. Las regiones que mostraron mayor dificultad en el alineamiento en comparación con ITS fueron CHS-1 y GAPDH, debido a que los genes multilocus no son genes utilizados de manera universal o de manera general para todos los microorganismos

Los árboles que mostraron un mejor arreglo fue el realizado con ITS, por lo cual es el más usado en la identificación filogenética. El árbol filogenético que genero mayor diferenciación a nivel de especies fue el realizado con el análisis multilocus, ya que en

este análisis se obtuvo mayor información del genoma de cada individuo y por lo tanto una mayor discriminación (Figura 13).

Todos estos microorganismos encontrados en el presente estudio, están asociados a la planta como parásitos pudiendo o no causar un proceso de patogénesis. Este conocimiento será de utilidad para los productores de plántulas en vivero en el cual la calidad fitosanitaria del material utilizado para propagación debería estar libre de posibles patógenos que en condiciones ambientales favorables puedan iniciar una epidemia y dispersar la enfermedad en zonas donde han estado ausente o mantenerse de manera asintomática para transmitirse de una generación a otra.

VI. CONCLUSIONES

Los microorganismos asociados a material propagativo de arándano proveniente de un vivero del estado de Michoacán pertenecen a las especies *Alternaria* sp., *Epicoccum nigrum*, *Epicoccum sorghi*, *Geomyces* sp., *Trichoderma* sp., *Hypocrea rufa*, *Sporotrix variecibatus*, *Pantoea* sp., *Pseudomonas* sp., *Curtobacterium* sp, *Burkholderia* sp., *Delfia* sp. *Sphingomonas* sp, *Novosphingobium* sp. y *Leifsonia* sp. asociados a raíz, tallo y hojas En cuanto a los análisis moleculares para la identificación filogenética de las especies utilizar otro gen para poder distinguir entre las especies del género *Alternaria*. Además de obtener la secuencia completa del gen 16s rRNA para *Pseudomonas* sp. y utilizar iniciadores específicos con el fin de precisar si es una nueva especie o al grupo de *Pseudomonas in sensu stricto* a la que pertenece el aislamiento.

No se presentó crecimiento de microorganismos asociados a plántulas *in vitro*.

Esterilizar el substrato en el cual son colocadas las plántulas en el vivero, ya que puede ser una fuente de contaminación en la planta, antes de ser llevadas a campo. Verificar el proceso de producción de material vegetal.

VII. LITERATURA CITADA

- Alkharouf, N. W., Dhanaraj, A. L., Naik, D., Overall, C., Matthews, B. F., and Rowland, L. J. 2007. BBGD: an online database for blueberry genome data. *BMC Plant Biol.* 7:1-7.
- Baino, O., Ramallo, A. C., Hongn, S., and Ramallo, J. C. 2007. First report of *Dothichiza caroliniana* causing double spot on high bush blueberry in South America. *Plant Dis.* 91:1685.
- Bain, J. M., Tavanti, A., Davidson, A. D., Jacobsen, M. D., Shaw, D., Gow, N. A. R. and Odds, F. C. 2007. Multilocus sequence typing of the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *J. Clin. Microbiol.* 45:1469–1477.
- Baldauf, S. L. and Doolittle, W. F., 1997. Origin and evolution of slime molds (Mycetozoa). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:12007–12012.
- Begerow, D., John, B. and Oberwinkler, F. 2004. Evolutionary relationships among β -tubulin gene sequences of basidiomycetous fungi. *Mycol. Res.* 108: 1257-1263.
- Bell, R. 2006. Australian blueberry industry. pp. 250-254 in: *Blueberries for Growers, Gardeners and Promoters*. Childers Publications, Gainesville.
- Bosshard, P. P., Abels, S., Zbinden, R., Bottger, E. C., and Altwegg, M. 2003. Ribosomal DNA sequencing for identification of aerobic gram-positive rods in the clinical laboratory (an 18-month evaluation). *J. Clin. Microbiol.* 41:4134–4140.
- Borneman, J., and Hartin, R. J. 2000. PCR Primers that amplify fungal rRNA genes from environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:4356-4360.

- Carbone, I., and Kohn, M. L. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*. 91:553-555.
- Caruso, F. L., and Ramsdell, D. C. 1995. *Compendium of Blueberry and Cranberry Diseases*. APS Press.
- Coeny, T., Gevers, D., Van de Peer, Y., Vandamme, P., and Swings, J. 2004. Towards a prokaryotic genomic taxonomy. *FEMS Microbiol. Rev.* 29:147-167.
- Colin, D. K., and Bruce, J. H. 2002. The effect of wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) consumption on post prandial serum antioxidant status in human subjects. *Br. J. Nutr.* 88:389-397.
- Cooper, J. E., and Feil, E. J. 2006. The phylogeny of *Staphylococcus aureus* – which genes make the best intra-species markers? *Microbiol.* 152:1297- 1305.
- Crous, P. W., Groenewald, J. Z., Risède, J. M., Simoneau, P., and Hywel-Jones, N. L. 2004. *Calonectria* species and their *Cylindrocladium* anamorphs: species with sphaeropedunculate vesicles. *Stud. Mycol.* 50: 415–430.
- Cruz-Francisco, G. 2011. Identificación de microorganismos asociados a enfermedades del arándano (*Vaccinium* sp.) durante el periodo de primavera, en Los Reyes, Michoacán. Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Daniel, H. M., Sorrell, T. C., and Meyer, W. 2001. Partial sequence analysis of the actin gene and its potential for studying the phylogeny of *Candida* species and their teleomorphs. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:1593–1606.

Edel, V. 1998. Polymerase chain reaction in mycology: an overview. pp 1-2 in: Applications of PCR in Mycology. P. D. Bridge, D. K. Arora, C. A. Reddy and R. P. Elander, eds. CAB international.

Eden, P. A., Schmidt, T. M., Blakemore, R. P., and Pace, N. R. 1991. Phylogenetic analysis of *Aquaspirillum magnetotacticum* using polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA-specific DNA. Int. J. Syst. Bacteriol. 41:324-325.

Edgcomb, V. P., Roger, A. J., Simpson, A. G. B., Kysela, D. T., and Sogin, M. L. 2001. Evolutionary relationships among “jakobid” flagellates as indicated by alpha- and beta-tubulin phylogenies. Mol. Biol. Evol. 18:514–522.

Ehlenfeld, M. K. 2009. Domestication of the highbush blueberry at Whitesbog, New Jersey, 1911-1916. Acta Hort. 810:147-152.

Einax, E., and Voigt, K. 2002. Oligonucleotide primers for the universal amplification of β -tubulin genes facilitate phylogenetic analyses in the regnum Fungi. Org. Divers. Evol. 3:185–194.

Espinoza, J. G., Briceño, E. X., Keith, L. M., and Latorre, B. A. 2008. Canker and twig dieback of blueberry caused by *Pestalotiopsis* spp. and a *Truncatella* sp. in Chile. Plant Dis. 92:1407-1414.

Gardes, M., and Bruns, T. D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes--application to the identification of mycorrhizae and rusts. Mol. Ecol. 2:113-118.

Greeff, M. P., and Greeff, P. F. 2006. Blueberries in South Africa. pp. 255-256 in: Blueberries for Growers, Gardeners and Promoters. Childers Publications, Gainesville.

Guerber, J. C., Liu, B., and Correll, J. C. 2003. Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum sensu lato* by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility. *Mycologia* 95:872–895.

Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41:95-98.

Hancock, J. F., Lyrene, P., Finn, C. E., Vorsa, N. Y., and Lobos, G. A. 2008. Blueberries and Cranberries. pp. 115-149 in: *Temperate Fruit Crop Breeding*. Springer Science + Business Media B.V.

Haralson, J. C., Brannen, P. M., Nesmith, D. S., and Sherm, H. 2013. Chemical control of *Cylindrocladium* and *Rhizoctonia* root rots in blueberry propagation. *Crop Prot.* 44:1-5.

Hasegawa, M. and Hashimoto, T. 1993. Ribosomal RNA trees misleading?. *Nature* 361:23.

HersHKovitz, M. A., and Lewis, L. A. 1996. Deep-level diagnostic value of the rDNA-ITS region. *Mol. Biol. Evol.* 13:127-1295.

Hightower, R. C., and Meagher, R. B. 1986. The molecular evolution of actin. *Genetics* 114:315-332.

- Holland, R. M., Christiano, R., Gamliel-Atinsky, E., and Scherm, H. 2013. Distribution of *Xylella fastidiosa* in blueberry stem and root sections in relation to disease severity in the field. *Plant Dis.* 98:443-447.
- Hongoh, Y., Yuzawa, H., Ohkuma, M., and Kudo, T. 2006. Evaluation of primers and PCR conditions for the analysis of 16S rRNA genes from a natural environment. *FEMS Microbiol. Lett.* 221:299-304.
- Janda, J. M., and Abbott, S. L. 2007. 16S rRNA Gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. *J. Clin. Microbiol.* 45:2761–2764.
- Karen, O., Hogberg, N., Dahlberg, A., Jonsson, L., and Nylund, J. E. 1997. Inter- and intraspecific variation in the ITS region of rDNA of ectomycorrhizal fungi in *Fennoscandia* as detected by endonuclease analysis. *New Phytol.* 136: 313-325.
- Kałużna, M., Puławska, J. and Meszka, B. 2013. A new bacterial disease on blueberry (*Vaccinium corymbosum*) caused by *Pseudomonas* spp. *J. Plant Prot. Res.* 53:32.
- Keith, L., Sugiyama, L., Strauss, A., Kai, R., Zee, F., Hamasaki, R., Yamasaki, M., and Nakamoto, S. 2008. First report of leaf rust of blueberry caused by *Pucciniastrum vaccinii* in Hawaii. *Plant Dis.* 92:1590.
- Keller, P. M., Rampini, S. K., Buchler, A. C., Eich, G., Wanner, R. M., Speck, R. F., Bottger, E. C., and Bloemberg, G. V. 2010. Recognition of potentially novel human disease-associated pathogens by implementation of systematic 16S rRNA gene sequencing in the diagnostic laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 48:3397–3402.

- Kitamoto, N., Matsui, J., Kawai, Y., Kato, A., Yoshino, S., Ohmiya, K., and Tsukagoshi, N. 1998. Utilization of the TEF1- α gene (*TEF1*) promoter for expression of polygalacturonase genes, *pgaA* and *pgaB*, in *Aspergillus oryzae*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 50: 85-92.
- Knutsen, A.K., Torp, M., and Holst-Jensen, A. 2004. Phylogenetic analyses of the *Fusarium poae*, *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium langsethiae* species complex based on partial sequences of the translation elongation factor-1 alpha gene. Int. J. Food Microbiol. 95:287-95.
- Lewis, C. T., Bilkhu, S., Robert, V., Eberhardt, U., Szoke, S., Seifert, K. A., and Lévesque, C. A. 2011. Identification of fungal DNA barcode targets and PCR primers based on Pfam protein families and taxonomic hierarchy. The Open Applied Informatics Journal. 5: 30-44.
- Lim, T. K. 2012. *Vaccinium corymbosum* in: edible medicinal and non-medicinal plants. Fruits 2:452-464.
- Lu, L., Li, J., and Cang, Y. 2002. PCR-based sensitive detection of medicinal fungi *Hericium* species from Ribosomal Internal Transcribed Spacer (ITS) sequences. Biol. Pharm. Bull. 25:975-980.
- Ludwig, W., and Schleifer, K. H. 1994. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. FEMS Microbiol. Rev. 15:155-173.
- McKean, P. G., Vaughan, S., and Gull, K. 2001. The extended tubulin superfamily. J. Cell Sci. 114:2723–2733.

Maiden, M. C. J. 2006. Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 60:561–88.

Martin, K. J., and Rygiewicz, P. T. 2005. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiol.* 5:28.

Matheucci, E., Henrique-Silva, F., El-Gogary, S., Rossini, C. H. B., Leite, A., Escobar-Vera, J., Carle-Urioste, J.C., Crivellaro, O. and El-Dorry, H. 1995. Structure, organization and promoter expression of the actin-encoding gene in *Trichoderma reesei*. *Gene.* 161:103-106.

Mehmann, B., Brunner, I., and Braus, G. H. 1994. Nucleotide sequence variation of chitin synthase genes among ectomycorrhizal fungi and its potential use in taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:3105-3111.

Mignard, S., and Flandrois, J. P. 2008. A seven-gene, multilocus, genus-wide approach to the phylogeny of mycobacteria using supertrees. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58:1432–1441.

Narayanasamy, P. 2008. Molecular techniques for detection of microbial pathogens. pp. 7-85 in: *Molecular biology in plant pathogenesis and disease management. Volumen I.* ed. Springer.

Naser, S. M., Hagen, K. E., Vancanneyt, M., Cleenwerck, I., Swings J., and Tompkins, T. A. 2006. *Lactobacillus suntoryeus* Cachat and Priest 2005 is a later synonym of *Lactobacillus helveticus* (Orla-Jensen 1919) Bergey et al. 1925 (Approved Lists 1980). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56:355–360.

Naser, S., Thompson, F. L., Hoste, B., Gevers, D., Vandemeulebroecke, K., Cleenwerck, I., Thompson, C. C., Vancanneyt, M. and Swings, J. 2005. Phylogeny and identification of *Enterococci* by *atpA* gene sequence analysis. *J. Clin. Microbiol.* 43:2224–2230.

Nilsson, R. H., Kristiansson, E., Ryberg, M., Hallenberg, N., and Larsson, K. H. 2008. Intraspecific ITS variability in the kingdom fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. *Evol. Bioinform. Online* 4:193–201.

Odds, F. C. and Jacobsen, M. D. 2008. Multilocus sequence typing of pathogenic *Candida* species. *Eukaryot Cell.* 7:1075–1084.

O'Donnell, K. 1993. *Fusarium* and its near relatives, p. 225–233 in: The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics. CAB International, Wallingford, United Kingdom.

O'Donnell, K., and Cigelnik, E. 1997. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are Nonorthologous. *Mol. Phylogenet. Evol.* 7:103–116.

O'Donnell, K., Kistler, H. C., Cigelnik, E., and Ploetz, R. C. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:2044–2049.

Olsen, G. J., Lane, D. J., Giovannoni, S. J., and Pace, N. R. 1986. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Ann. Rev. Microbiol.* 40:337–65.

Pascual, J., Macián, M. C., Arahal, D. R., Garay, E., and Pujalte, M. J. 2010. Multilocus sequence analysis of the central clade of the genus *Vibrio* by using the 16S rRNA, *recA*, *pyrH*, *rpoD*, *gyrB*, *rctB* and *toxR* genes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60:154–165.

Peacock, S. J., De Silva, G. D. I., Justice, A., Cowland, A., Moore, C. E., Winearls, C. G., and Day, N. P. J. 2002. Comparison of multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis as tools for typing *Staphylococcus aureus* isolates in: A microepidemiological setting. *J. Clin. Microbiol.* 40:3764–3770.

Pérez-Losada, M., Cabezas, P., Castro-Nallar, E., and Crandall, K. A. 2013. Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology. *Infect. Genet. Evol.* 16:38-53.

Pollard, T. D., and Cooper, J. A. 1986. Actin and actin-binding proteins: a critical evaluation of mechanisms and functions. *Annu. Rev. Biochem.* 55:987-1035.

Prodorutti, D., Vanblaere, T., Gobbin, D., Pellegrini, A., Gessler, C., and Pertot, I. 2009. Genetic diversity of *Armillaria* spp. infecting highbush blueberry in northern Italy (Trentino region). *Plant Dis.* 99:651-658.

Rantakokko-Jalava, K., Nikkari, S., Jalava, J., Eerola, E., Skurnik, M., Meurman, O., Ruuskanen, O., Alanen, A., Kotilainen, E., Toivanen, P. and Kotilainen, P. 2000. Direct amplification of rRNA genes in diagnosis of bacterial infections. *J. Clin. Microbiol.* 38:32-39.

Ratnaparkhe, M. B. 2007. Blueberry.in: fruit and nuts, genome mapping and molecular breeding in plants. *Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants*. CABI 4:217-227.

Rebollar-Alviter, A., Minnis, A. M., Dixon, L. J., Cattlebury, L. A., Ramírez-Mendoza, M. R., Silva-Rojas, H. V., and Valdovinos-Ponce, G. 2011. First report of leaf rust of blueberry caused by *Thekopsora minima* in Mexico. *Plant Dis.* 95:772.

Rebollar-Alviter, A., Boyzo-Marin, J., Silva-Rojas, H. V., and Ramirez, G. 2013. Fungi and oomycete pathogens causing stem blight and root rots on blueberry in central Mexico. *Phytopathology* 113:S119.

Retamales, J. B., and Hancock, J. F. 2012. The blueberry Industry. pp 1-17 in: *Blueberries*. CABI.

Richter, D., Postic, D., Sertour, N., Livey, I., Matuschka, F. R. and Baranton, Guy.2006. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species by multilocus sequence analysis and confirmation of the delineation of *Borrelia spielmanii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56:873–881. DOI 10.1099/ijs.0.64050-0

Ronquist, F., and Huelsenbeck J. P. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic reference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.

Rowland, L. J., Hancock, J. F., and Bassil, N. V. 2011. Blueberry. pp 1-3 in: *Genetics, Genomics and Breeding of Berries*. Science Publishers.

Sadowsky, J. J., Miles, T. D., and Schilder, A. M. C. 2011. First report of stem blight caused by *Calonectria colhounii* (anamorph *Cylindrocladium colhounii*) on greenhouse-grown blueberries in the United States. *Plant Dis.* 95:1187.

Saunders, N. A., and Holmes, A. 2007. Multilocus Sequence Typing (MLST) of *Staphylococcus aureus*. pp. 71-85 in: *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Protocols*. Yinduo Ji. Volumen 391. ed. Humana Press Inc.

Scherm, H., NeSmith, D. S., Horton, D. L., and Krewer, G. 2001. A survey of horticultural and pest management practices of the Georgia blueberry industry. *Small Fruits Rev.* 1:17-28.

Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S. M., Robert, V. A., Spouge, J. L., Lévesque, C. A., Chen, W., and Fungal Barcoding Consortium. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *PNAS* 16:6241-6246.

Song, J.M., Picologlou, S., Grant, C. M., Firoozan, M., Tuite, M. F. and Liebman, S. 1989. Elongation Factor EF-1 α gene dosage alters translational fidelity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 9:4571-4575.

Song, G. Q., and Hancock, J. F. 2011. *Vaccinium*. pp 197-221 in: *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources*. Springer Berlin Heidelberg.

Tamura, K., Stecher G., Peterson D., Filipski A. and Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30:2725-2729.

Taquini, I. L. 2006. Argentine blueberry. pp 255-256 in: Blueberries for Growers, Gardeners and Promoters. Childers Publications, Gainesville.

Taylor, J. W. and Fisher, M. C. 2003. Fungal multilocus sequence typing — it's not just for bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 6:351–356.

Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson T.J. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680.

Unkles, S. E., Moom, R. P., Hawkins, A. R., Duncan, J. M. and Kinghorn, R. 1991. Actin in the oomycetous fungus *Phytophthora infestans* is the product of several genes. *Gene* 100:105-112.

Van 't Klooster, J. W., Van den Berg-Velthuis, G., Van West, P. and Govers, F. 2000. *tef1*, a *Phytophthora infestans* gene encoding translation elongation factor 1 α . *Gene* 249: 145–151.

Vázquez, J. A. y Berrón, S. 2004. Multilocus sequence typing: el marcador molecular de la era de Internet. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2:113-120.

Ventura, M., Canchaya, C., Meylan, V., Klaenhammer, T. R., and Zink, R. 2003. Analysis, characterization, and loci of the *tuf* genes in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species and their direct application for species identification. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 6908–6922.

Wang, D. Y. C., Kumar, S. & Hedges, S. B. 1999. Divergence time estimates for the early history of animal phyla and the origin of plants, animals and fungi. *Proc. R. Soc. Lond. B* 266: 163–171.

Weider, L. J., Elser, J. J., Crease, T. J., Mateos, M., Cotner, J. B., and Markow, T. A. 2005. The functional significance of ribosomal (r)DNA variation: Impacts on the evolutionary ecology of organisms. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 36:219–42.

Weingartner, D. P., and Klos, E. J. 1974. Fungi associated with blueberry stems in Michigan. *Pl. Dis. Rep.* 58:180-181.

Wildeman, A.G. 1988. A putative ancestral actin gene present in a thermo-philic eukaryote: novel combination of intron positions. *Nucleic Acids Res.* 16:2553-2564.

Wilson, K. H., Blitchington, R. B., and Greene, R. C. 1990. Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 28:1942-1946.

Woese, C. R., and Fox, G. E. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74:5088-5090.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp 315-322 in: *PCR Protocols*. Academic Press, San Diego, CA.

Wright, E. R., Rivera, M. C., Esperón, J., Cheheid, A. and Rodríguez-Codazzi, A. 2004. *Alternaria* leaf spot, twig blight, and fruit rot of highbush blueberry in Argentina. *Plant Dis.* 88:1383.

Yamamoto, S., Kasai, H., Arnold, D. L., Jackson, R., W., Vivian, A., and Harayama, S. 2000. Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. *Microbiol.* 146: 2385–2394.

Young, J. M. and Park, D.C. 2007. Relationships of plant pathogenic enterobacteria based on partial *atpD*, *carA*, and *recA* as individual and concatenated nucleotide and peptide sequences. *Syst. Appl. Microbiol.* 30: 343–354.

Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., and Miller, W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology* 7:203-214.

Zuckerman, B. M. 1960. Fungi collected from blueberry stems in Massachusetts. *Pl. Dis. Reporter* 44: 416.

