



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE AISLAMIENTOS DE *Penicillium* sp. OBTENIDOS DE FRUTOS DE MANZANA (*Malus x domestica* Borkh) EN MÉXICO Y PRUEBAS DE AGRESIVIDAD.

Omar Hernández Romero

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2014

La presente tesis titulada: **CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE AISLAMIENTOS DE *Penicillium* sp. OBTENIDOS DE FRUTOS DE MANZANA (*Malus x domestica* Borkh) EN MÉXICO Y PRUEBAS DE AGRESIVIDAD** realizada por el alumno: **Omar Hernández Romero** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO

Dr. Ángel Lagunes Tejeda

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Daniel Nieto Ángel

ASESOR

Dr. Mario Orozco Santos

ASESOR

M.C. Luis Alfonso Aguilar Pérez

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Agosto de 2014

AGRADECIMIENTOS

Al pueblo de México que por medio de sus contribuciones al erario hicieron posible mi sustento en este periodo a través de la beca de CONACYT y el presupuesto otorgado al Colegio de Postgraduados. Sin sus impuestos no hubiese logrado este sueño.

A mi consejo particular, al Dr. Ángel Lagunes Tejeda, al Dr. Mario Orozco Santos y al M.C. Luis Alfonso Aguilar Pérez por sus tan valiosas y acertadas aportaciones en esta investigación; y especialmente al Dr. Daniel Nieto Ángel por su invaluable amistad, por darme la oportunidad de realizar este trabajo y sobretodo creer en mí; ¡Gracias Doc!

A las personas que me ayudaron en el trabajo de laboratorio: M.C. Camilo Hernández Juárez e Ing. Verónica Inés Martínez Bustamante, en la parte de biología molecular; M.C. Victoria Ayala Escobar, en la caracterización morfológica; a la Biol. Greta Hanako Rosas Saito por las hermosas fotos en la Unidad de Microscopia Electrónica; al Lab. Oscar Moreno Cernas por su apoyo incondicional en el laboratorio y por su amistad; y especialmente a la M.C. Leticia Robles Yerena por sus sabios consejos y por esas desveladas en el laboratorio, ¡Gracias Lety!

A ti mi amor que siempre me ayudaste en toda mi investigación, por tus categóricas contribuciones y que al final, resultaste hacer las cosas mejor que yo. Siempre estuviste ahí para alentarme a seguir adelante ¡Muchas gracias corazón!

Al cuerpo docente y administrativo del Colegio de Postgraduados que directa o indirectamente hicieron posible mi formación en esta prestigiada casa de estudios; sin duda alguna no hubiese llegado hasta aquí sin sus conocimientos y consejos.

A los “weros” Nayeli y Edgar por su gran amistad y su apoyo en las colectas y trabajo de laboratorio. A Hugo “Mae” por su inmensurable amistad y aportación a esta tesis. Y a todos mis compañeros de clases; gracias por compartir y transferir sus conocimientos y por los momentos felices en mi estancia en el Colegio.

A todas las personas que se me estén olvidando y hayan contribuido directa o indirectamente en la realización de mi meta.

¡Muchas gracias a todos y que Dios los bendiga!

DEDICATORIA

A ti Dios Padre Eterno por darme la vida, por la oportunidad de concluir este proyecto y por mandarme a todas las personas que están a mí alrededor.

A ti Gabriela, mi razón de ser, gracias por hacerme creer en el amor, por enseñarme las cosas bonitas de la vida y que hayas llegado a mí cuando más lo necesitaba. Por ello y muchas cosas más, eres el amor de mi vida...TE AMO mi linda esposa.

A ustedes Blanca y Cruz Juvenal mis amados padres; por ser los mejores papas que hubiera podido tener. Se dicen orgullosos de mí pero yo estoy más orgulloso de ser su hijo. Por ser el motor de mi vida y un digno ejemplo a seguir...LOS AMO.

A ustedes mis tres “gorditos” Jade Guadalupe, María de Jesús y Cruz Ángel, mis sobrinitos queridos; siempre rijan sus vidas por el camino del bien y en lo que realicen procuren ser siempre los mejores. Nunca olviden que LOS AMO.

A mi demás familia, mis abuelitas, mis tíos (as), mis primos (as) y especialmente a mis hermanos Reynaldo y Víctor Martín. Gracias a Dios por la familia que me dio.

A todos mis amigos de la vida: (los menciono al azar) Cheli, Gloriali, Hugo, Roxana, Raúl, Nayeli y Edgar, Eirelinda, Dana e Isaías, Fernando, Reyna Vargas, Eli, Malena y Antonio y finalmente a ti Reinita† donde quiera que estés.

CONTENIDO

	Página
AGRADECIMIENTOS	ii
DEDICATORIA	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE TABLAS	viii
RESUMEN GENERAL	1
GENERAL SUMMARY	2
INTRODUCCIÓN GENERAL	3
OBJETIVOS	8
LITERATURA CITADA	9
CAPITULO I. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE	
<i>Penicillium</i> sp. EN FRUTOS DE MANZANA	
RESUMEN	11
ABSTRACT	12
1.1 Introducción	13
1.2 Materiales y Métodos	16
1.3 Resultados y Discusión	24
1.4 Conclusiones	39
1.5 Literatura Citada	40

CAPÍTULO II AGRESIVIDAD DE *Penicillium* sp. EN FRUTOS DE MANZANA VAR.

GOLDEN DELICIOUS

RESUMEN	45
ABSTRACT	46
2.1 Introducción	47
2.2 Materiales y Métodos	50
2.3 Resultados y Discusión	54
2.4 Conclusiones	61
2.5 Literatura Citada	62
CONCLUSIONES GENERALES	65

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN		Página
FIGURA I.	Principales estados productores de manzana.	5
FIGURA II.	Producción y superficie sembrada de manzana a nivel nacional.	5
CAPITULO I		
Figura 1.	Tipos de conidióforos en el género <i>Penicillium</i> .	15
Figura 2.	Localización del origen de la fruta muestreada.	16
Figura 3.	Aislamientos de <i>Penicillium</i> sp. a) frutos en cámara húmeda; b) crecimiento en PDA del hongo; c) crecimiento en agar y d) crecimiento del cultivo puro en PDA.	17
Figura 4.	Conservación de las colonias, a) barrido de glicerol en la colonia pura; b) y c) almacenamiento en tubos eppendorf.	18
Figura 5.	<i>Penicillium</i> sp. en frutos de manzana a) fruto con pudrición blanda color marrón; b) fruto con esporulación verdosa; c) estructura característica del genero <i>Penicillium</i> d) cadena de conidios sobre fiálide y métula.	24
Figura 6.	Diversidad de texturas y colores de colonias de <i>Penicillium</i> sp. en MEA.	26
Figura 7.	Crecimiento en PDA de <i>Penicillium</i> sp.	26
Figura 8.	Estructuras de <i>Penicillium expansum</i> con la técnica de Microscopia de Electrónica Barrido. a) y b) aislamiento 17A1; c) aislamiento 18A2; d) aislamiento 35B1; e) aislamiento 5_2; f) aislamiento 14A1; w: conidióforo, x: métula, y: fiálide, z: cadena de conidios.	34
Figura 9.	Concentración de ADN obtenido de micelio y esporas de <i>Penicillium</i> sp.	35
Figura 10.	Dendrograma obtenido de las secuencias de 25 cultivos monospóricos de <i>Penicillium</i> sp. de frutos de manzana del Estado de Chihuahua, comparadas con las especies <i>P. expansum</i> , <i>P. radicum</i> y <i>P. chrysogenum</i> .	38

CAPITULO II		Página
Figura 1.	Localización del origen de la fruta muestreada.	50
Figura 2.	Pruebas de agresividad en frutos de manzana; a) pinchado con mondadientes, b) cámara húmeda con 8 repeticiones, c) y d) esporulación del hongo.	53
Figura 3.	Síntomas y signos de pudrición por <i>Penicillium expansum</i> a) pudrición moderada con esporulación y b) pudrición que llena casi en su totalidad al fruto con esporulación.	54
Figura 4.	Crecimiento de las lesiones de aislamientos de <i>Penicillium expansum</i> de 2 hasta 10 DDI.	55
Figura 5.	Agresividad de los cultivos de <i>Penicillium expansum</i> inoculados sobre frutos de manzana variedad Golden delicius a los 2, 6 y 10 días después de la inoculación (DDI).	55
Figura 6.	Grado de agresividad de 25 aislamientos de <i>Penicillium expansum</i> obtenidos de frutos de manzana provenientes del estado de Chihuahua a los 10 días después de la inoculación en frutos variedad Golden Delicius.	58

ÍNDICE DE TABLAS

INTRODUCCIÓN		Página
Tabla I.	Datos de nutrición de una manzana	4
CAPITULO I		
Tabla 1.	Aislamientos obtenidos de los muestreos.	18
Tabla 2.	Concentración de la mezcla de amplificación.	22
Tabla 3.	Forma, tamaño y divisiones del conidióforo de los aislamientos de <i>Penicillium</i> sp.	27
Tabla 4.	Superficie, forma y diámetros de conidios.	28
Tabla 5.	Longitud de fiálide y métula.	30
Tabla 6.	Especies de <i>Penicillium</i> sp. obtenidas de frutos de manzana caracterizadas morfológicamente.	31
Tabla 7.	Especies resultantes de la caracterización molecular por PCR.	36
CAPITULO II		
Tabla 1.	Aislamientos utilizados para las pruebas de agresividad de <i>Penicillium</i> sp.	51
Tabla 2.	Agresividad de aislamientos de <i>Penicillium expansum</i> , observada a diferentes días, sobre frutos de manzana, variedad Golden delicious.	56
Tabla 3.	Crecimiento acumulado de 12 aislados de <i>Penicillium expansum</i> inoculados en frutos de manzana var. Golden Delicious en 4 periodos de incubación del día 2 al día 10 después de la inoculación, evaluada con base en el área bajo la curva del progreso de la enfermedad de los diámetros de la lesión.	59

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE AISLAMIENTOS DE *Penicillium* sp. OBTENIDOS DE FRUTOS DE MANZANA (*Malus x domestica* Borkh) EN MÉXICO Y PRUEBAS DE AGRESIVIDAD

Omar Hernández Romero, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2014

Según FAO-SAGARPA la manzana es de los productos más cultivados en el mundo; en México para 2012 se tuvo una producción de 375,044.9 ton de una superficie de 58, 451.25 ha y un promedio de rendimiento de 6.42 ton.ha⁻¹; logrando con ello un valor de la producción de 3,008.86 millones de pesos. El estado de Chihuahua tiene la mayor área cosechada para este año con 25, 123 has. Durante el almacenamiento postcosecha de la manzana ocurren pérdidas debidas a hongos, de los cuales más de 80% son atribuidas a la pudrición azul (*Penicillium expansum* Link). La identificación de estas especies con base a las características morfológicas es imprecisa pues hay variación entre los aislados de una misma especie. Las técnicas moleculares basadas en el análisis de ADN son muy específicas y sensibles. En esta trabajo 118 aislamientos de *Penicillium* sp. provenientes de Chihuahua fueron colectados en el año 2013. La caracterización molecular de 25 de estos cultivos se realizó mediante PCR-ITS, se secuenció el producto de PCR y se confirmó a *Penicillium expansum*. Para la caracterización morfológica se utilizaron los medios de cultivo Potato-Dextrose-Agar (PDA) y Malta-Extracto de malta (MEA). Las colonias presentaron diversidad de formas, colores y tamaños en ambos medios. Hubo también diversidad en la longitud y formas del conidióforo, fialide, métula, y conidios y hubo traslape intra y interespecífico. La agresividad de 25 cultivos monospóricos se midió en base al diámetro de las lesiones desarrolladas en frutos de manzana var Golden Delicious, desde los 2 hasta los 10 días después de la inoculación. Solo 12 de los 25 aislados de *Penicillium expansum* presentaron síntomas de pudrición blanda, acuosa, color pardo claro. En la superficie aparece primero un moho blanco que luego se torna verde-azulado. Se confirmó a *P. expansum* como la especie más agresiva en Chihuahua, México.

Palabras clave: *Penicillium expansum*, pudrición azul, postcosecha, medios de cultivo, PCR.

**MOLECULAR AND MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF ISOLATION OF
Penicillium sp., OBTAINED FROM APPLE FRUITS (*Malus x domestica* Borkh) IN
MEXICO, AND AGGRESSIVENESS TESTS**

Omar Hernández Romero, M. Sc.

Colegio de Postgraduados, 2014

According to FAO-SAGARPA, apple is one of the most cultivated fruit in the world. By 2012, there were 375,044.9 ton production in Mexico; it was cultivated in 58,451.25 ha with an average yield of 6.42 ton ha⁻¹. As a result, the production value achieved 3,008.86 pesos millions. The Chihuahua State has the most harvested area in this year with 25,123 ha. There are losses due to fungi during the post-harvest apple storage. Most of the 80% losses are attributed to blue rot (*Penicillium expansum* Link). The identification of these species based on morphological characteristics is imprecise because there is a variation among isolated organisms of the same species. Molecular techniques based on DNA analysis are so specific and sensitive. In this document, 118 isolates of *Penicillium* sp., were collected from Chihuahua State in 2013. The molecular characterization of these 25 samples, was carried out by PCR-ITS. The PCR product was sequenced and confirmed as *Penicillium expansum*. To morphological characterization, were used Papa-Dextrosa-Agar (PDA) and Malt Extract-Agar (MEA); both of them, colonies showed diversity of shapes, colors and sizes. There was diversity in length and shape of conidiophore, fialide, metula, and conidia. There was overlap intra and interspecific, too. The aggressiveness of 25 monosporic samples was measured based on the diameter of the lesions developed in Golden Delicious apple fruits, in a period of 2 to 10 days after inoculation. Only 12 of 25 *Penicillium expansum* isolates, showed: soft rot, watery, and a light brown color. First, there appears a white mold on surface, and then it turns blue-green. *P. expansum* was confirmed as the most aggressive species in Chihuahua State, Mexico.

Key words: *Penicillium expansum*, blue rot, post-harvest, culture media, PCR.

INTRODUCCIÓN GENERAL

El manzano (*Malus x domestica* Borkh), es un árbol de la familia de las rosáceas, cultivado por su fruto y apreciado como alimento. Domesticado hace más de 15.000 años, su origen parece ser el Cáucaso y las orillas del mar Caspio. Fue introducido en Europa por los romanos y en la actualidad existen unas 1.000 variedades/cultivares, como resultado de innumerables hibridaciones entre formas silvestres. Actualmente se acepta que en la formación los manzanos cultivados han intervenido, al menos, *Malus sylvestris*, *Malus orientalis* Uglitzk. y *Malus sieversii* (Ledeb.) M.Roem. El manzano silvestre (*Pyrus malus* L), es nativo de Gran Bretaña. Bartholomeus Anglicus, cuya enciclopedia fue uno de los primeros libros impresos que contienen información botánica (que se está imprimiendo en Colonia hacia 1470), da un capítulo sobre la manzana (Grieve, 2014).

Según Potter *et al.*, (2007) el manzano se clasifica de la siguiente manera: Superreino: Eukaryota, Reino: Plantae, Subreino: Tracheobionta, División: Magnoliophyta, Clase: Magnoliopsida, Subclase: Rosidae, Orden: Rosales, Familia: *Rosaceae*, Subfamilia: *Amygdaloideae*, Tribu: Maleae, Género: *Malus*, Especie: *domestica*.

La variedad más cultivada en México es la Golden Delicious (Gobierno del Estado de Chihuahua, 2011), la cual tiene una pulpa blanca y muy firme, con un sabor dulce muy refrescante. Es la variedad preferida para cocinar porque retiene su forma y su rico y suave sabor cuando se hornea o cocina. Su cáscara es muy suave y delgada y no necesita pelarse para la mayoría de recetas. Golden Delicious es muy sabrosa en ensaladas frescas y es una buena elección para congelar (Illinois University, Extension Service, 2014).

Las manzanas son una fuente de fibra soluble e insoluble. La fibra soluble como pectina incluso ayuda a prevenir la formación de colesterol en las paredes de los vasos sanguíneos, de modo que reduce la incidencia de enfermedades del corazón y arteriosclerosis. La fibra insoluble de la manzana actúa como una almohadilla en la vía intestinal, reteniendo agua para limpiar y mover la comida fácilmente a través del sistema digestivo.

Tabla I. Datos de nutrición de una manzana

(*Una manzana mediana, 2-1/2 pulgadas, fresca, con cáscara)

Calorías 81	Hierro 0.25 mg
Carbohidratos 21 g	Sodio 0.00 mg
Fibra 4 gramos	Potasio 159 mg
Fibra Soluble	Vitamina C 8 mg
Fibra Insoluble	Vitamina A 73 IU
Calcio 10 mg	Ácido Fólico 4 mg
Fósforo 10 mg	

*El valor nutricional de las manzanas puede variar dependiendo de la variedad y tamaño.

Fuente: USDA Laboratorio de Información de Nutrientes – Manzanas.

La producción mundial para el 2011 ascendió a 75,484,671.39 toneladas con un rendimiento promedio de 15.9 ton.ha⁻¹ en un área cosechada de 4, 745,441.51 ha. China, Estados Unidos e India ocupan los tres primeros lugares en producción con 35,986,667.00, 4,275,108.00 y 2,891,000.00 ton respectivamente, ocupando México el lugar 20 en el ranking. En relación al rendimiento Austria, Suiza y Holanda lideran con 90, 78 y 50 ton.ha⁻¹ ocupando México el 45° lugar (FAOSTAT, 2013).

Para el caso específico de nuestro País, según datos del SIAP-SAGARPA (2013) se tuvo una producción de 375,044.9 ton de una superficie cosechada de 58, 451.25 ha y un promedio en el rendimiento de 6.42 ton.ha⁻¹; logrando con ello un valor de la producción que asciende a \$3,008, 862,990.00. El estado de Chihuahua tiene la mayor área cosechada para este año con 25, 123 has, seguido de Durango y Puebla con una superficie de 10,602.75 y 8,280.16 has respectivamente. En relación a la producción, el mismo estado de Chihuahua mantiene su hegemonía con 207,139.17 ton seguido de Durango (61,136.64 ton) y Coahuila (36,751.9 ton). Los rendimientos más altos pertenecieron a Morelos con 17.76 ton.ha⁻¹ y Veracruz con 11.02 ton.ha⁻¹. En la Figura I se aprecia la supremacía de la producción del Estado de Chihuahua; en la Figura II podemos apreciar el comportamiento y la tenencia de la producción nacional de este cultivo.

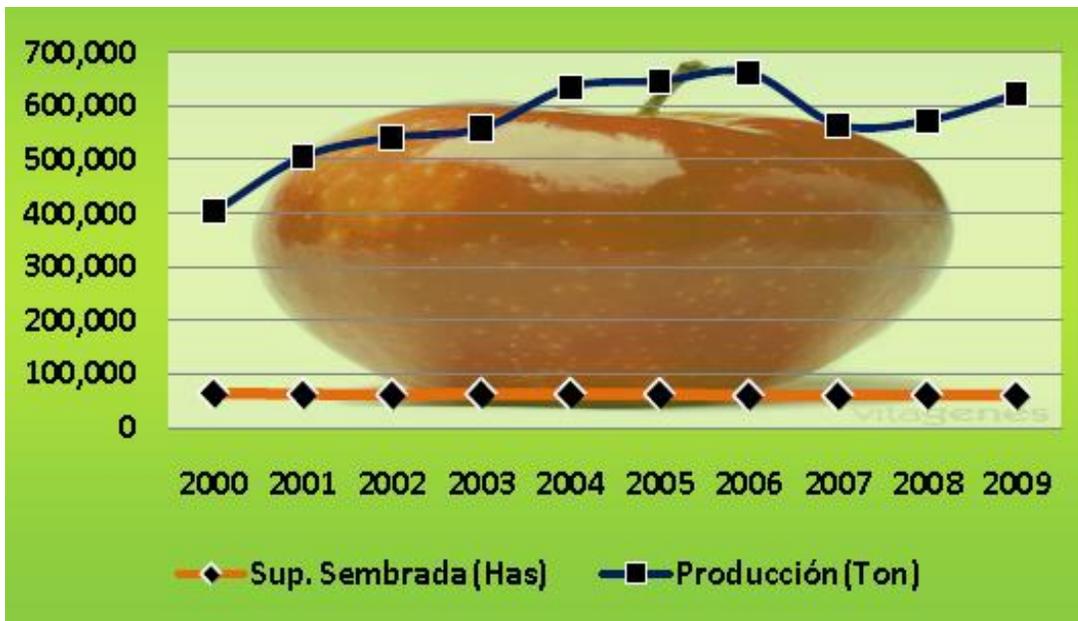
Figura I Principales estados productores de manzana.



Fuente: Análisis de competitividad. Gobierno del Estado de Chihuahua. 2011.

La estacionalidad de la producción a nivel nacional se centra entre los meses de julio a noviembre siendo el pico en septiembre con 47.75% de la producción (SIAP, 2012).

Figura II. Producción y superficie sembrada de manzana a nivel nacional.



Fuente: Análisis de competitividad. Gobierno del Estado de Chihuahua. 2011.

Entre las principales limitantes parasitarias que tiene el cultivo de manzano, destacamos 4 enfermedades de origen bacteriano, 55 enfermedades fungosas, 5 enfermedades causadas por nematodos, 7 enfermedades del tipo virales, 4 causadas por viroides, 4 fitoplasmas y 16 misceláneas y otros desordenes (APS, 2013). En relación a plagas insectiles y ácaros, el manzano es atacado por 24 insectos y ácaros (UC-IPM, 2011). Las plagas y enfermedades de mayor importancia son palomilla del fruto (*Cidya molesta*) pulgón lanigero (*Eri soma lanigeum*), picudo del manzano (*Amphidees latifrons*) escama de San José (*Quadraspidiotus Perniciosus*), roña (*Venturia inaequalis*) cenicillia (*Podosphaera leucotricha*), tizón de fuego (*Erwinia amylovora*) (APS, 2002).

En el estado de Chihuahua, México, principal productor de manzana del país, los costos del manejo de plagas en manzano (*Malus x domestica* Borkh) varían de 10.6 hasta el 22.2% de los costos totales de producción. A pesar de los recursos empleados para manejar dichos problemas, la permanencia de éstos es constante con oscilaciones periódicas que ponen en peligro la costeabilidad global de la cosecha, ocasionando pérdidas directas en cantidad y calidad (Ramírez *et al.*, 2004). Hablando estrictamente de las pérdidas causadas por las enfermedades de postcosecha son mayores a lo que generalmente se cree, porque el valor de las frutas y verduras aumenta varias veces al pasar desde el campo hasta el consumidor final (Eckert y Sommer, 1967). Las pérdidas económicas sufridas por enfermedades de almacenamiento en este cultivo puede ser superior a la causada por enfermedades de campo debido a las grandes inversiones en los tratamientos químicos, físicos, culturales, etc. para el manejo de dichas enfermedades y además de los procesos que el producto experimenta desde la cosecha hasta que llega al cliente, que incluyen la recolección, clasificación, empaque, envío y almacenamiento (Barkai, 2001).

Durante el almacenamiento postcosecha de la manzana ocurren pérdidas debidas principalmente a daños producidos por hongos, de los cuales más de 80% son atribuidas a la pudrición azul ocasionada por *Penicillium expansum* Link que es capaz de desarrollarse por debajo de 0°C (Spotts *et al.*, 1999).

Penicillium sp. penetra en los tejidos de su hospedante a través de aberturas en la cascara o corteza e incluso a través de lenticelas. Sin embargo, puede propagarse desde los frutos infectados a los sanos cuando la cascara intacta de estos últimos entra en contacto con la cascara

infectada de los primeros. Las pudriciones causadas por *Penicillium* sp. al principio tienen el aspecto de manchas blandas, aguanosas, ligeramente decoloradas y de tamaño variable, las cuales pueden aparecer en cualquier parte del fruto (Agrios, 2002). Los frutos atacados manifiestan un olor a humedad y las zonas de lesión consisten de masas blandas. Las esporas pueden llegar a sobrevivir durante largas temporadas en contenedores de madera, paredes, techos de frigoríficos, donde el hongo puede crecer y reproducirse (Snowdon, 1990).

Esta enfermedad es una preocupación económica no sólo para la industria de fruta fresca sino también a la industria de la transformación de frutas debido a que algunas cepas de *Penicillium expansum* pueden producir la micotoxina patulina, que pueden subir a niveles inaceptables y por lo tanto afectar a la calidad del derivado de la manzana.

En el huerto, *Penicillium expansum* sobrevive en restos orgánicos en el suelo del huerto, y tal vez en la corteza de árboles muertos. Los conidios se encuentran también presentes en el aire y en la superficie de la fruta. En las instalaciones de empaque, en los canales de agua y el agua de descarga del tanque para tratamientos a la fruta, son fuentes comunes de esporas de *Penicillium*. Las esporas de *P. expansum* son también comúnmente presentes en el aire y en las paredes de las salas de almacenamiento (Rosenberger, 1990).

La identificación de estas especies con base a las características morfológicas en medios de cultivo es imprecisa pues hay variación entre los aislados de una misma especie. Las técnicas moleculares basadas en el análisis de ADN son muy específicas y sensibles. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha desarrollado para detectar e identificar patógenos de plantas; especies de *Penicillium* sp. en manzana se han identificado con dichas técnicas (Pianzola *et al.*, 2004).

En México son pocos los trabajos dirigidos al estudio de las características morfológicas, fisiológicas y moleculares de las poblaciones de *Penicillium* sp. que atacan a manzana. Por todo ello el presente trabajo se enfoca en la evaluación de dichas características. Este tipo de información ayudará a entender el impacto de las medidas de control y permitir el desarrollo de nuevas y mejores estrategias para combatir la pudrición en postcosecha de manzanas.

Por lo cual se plantean los siguientes objetivos:

- Determinar la etiología del moho azul en manzana en México.
- Determinar la variación morfológica y molecular del agente causal del moho azul en manzana en México.
- Evaluar la agresividad de los cultivos puros en frutos de manzana variedad Golden Delicious.
- Determinar la identidad y variación molecular del moho azul en manzanas en postcosecha.

HIPÓTESIS

El principal agente causal de la pudrición blanda o moho azul en el Estado de Chihuahua es ocasionado por *Penicillium expansum*, siendo este hongo el más agresivo que causa dicha pudrición, habiendo diferencias intra e interespecíficas, agresiva y molecularmente.

LITERATURA CITADA

- Agrios N.G.2002. Fitopatología. Ed. Limusa. México 838 pp.
- American Phytopathological Society.2013. Common Names of Plant Diseases. APS USA. Linck de consulta <http://www.apsnet.org/publications/commonnames/Pages/Apple.aspx>. fecha de consulta. 20 de diciembre de 2013.
- Barkai-Golan R. 2001. Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables Development and Control Elsevier B.V. Holanda 418 pp.
- Castroviejo, S., Aedo, C., Cirujano, S., Laínz, M., Montserrat, P., Morales, R., Muñoz Garmendia, F., Navarro, C., Paiva, J. & Soriano, C. (eds.). 2012. Flora iberica 11. Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid.
- Eckert, J.W. and N.F. Sommer. 1967. Control of diseases of fruits and vegetables by postharvest treatment. Annual Review Plant Pathology. 5:391-432.
- FAOSTAT. 2013. Estadísticas de Producción Mundial. FAO-ONU.
- FAO-SAGARPA. 2000.- Evaluación del Programa de Transferencia de Tecnología. Chihuahua. (Alianza para el Campo). 123 pp.
- Grieve M. 2014. In Botanical, a Modern herbal. Linck de consulta: <http://www.botanical.com/botanical/mgmh/a/apple044.html>. Fecha de consulta: 29 de abril de 2014.
- Illinois University, Extention Service. Apples. Linck de consulta: http://urbanext.illinois.edu/apples_sp/varieties.cfm. Fecha de consulta: 29 de abril de 2014.
- Pianzola M. J., Moscatelli M. y Vero S. 2004 Characterization of Penicillium Isolates Associated with Blue Mold on Apple in Uruguay. Plant Disease. 88:23-28.
- Phytopathological Society. 2002. Plagas y Enfermedades del Manzano y del Peral. Ed. Mundi-Prensa. USA. 100 pp.

- Potter D. T. Eriksson, R. C. Evans, S. Oh, J. E. E. Smedmark, D. R. Morgan, M. Kerr, K. R. Robertson, M. Arsenault, T. A. Dickinson y C. S. Campbell. 2007 Phylogeny and classification of Rosaceae. *Plant Systematics and Evolution*. 266 (1–2): pp. 5–43.
- Ramírez L. M., Jacobo C.J., Ávila M. M., Gutiérrez G. R. 2004. Validación de un Sistema de Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades en Huertos de Manzano [*Malus sylvestris* (L.) Mill. var. domestica (Borkh.) Mansf.] en Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 22: 277-289.
- Rosenberger D. A. 1990. Blue mold. Pages 54-55 in: *Compendium of Apple and Pear Diseases*. A. L. Jones and H. S. Aldwinckle (ed.). American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2013. Linck de consulta: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/>. Fecha de consulta: 5 de enero de 2014.
- Snowdon, A.L. 1990. *Color Atlas of Post-Harvest Diseases and Disorders of Fruits and Vegetables*, Vol. 1, General Introduction and Fruits. CRC Press, Boca Raton FL.
- Spotts R. A. I.A. Cervantes E. A. Mielke. 1999. Variability in postharvest decay among apple cultivars. *Plant Disease*. 83:1051-1054.
- UC IPM. 2011. *Pest Management Guidelines: APPLE*. University of California. USA. 72 pp.
- USDA-ARS. United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service; Linck de consulta: <http://www.ars.usda.gov/is/espanol/np/fnr/fnr0110.es.htm>, fecha de consulta: 29 de abril 2014.

CAPITULO I: CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE *Penicillium* sp. EN FRUTOS DE MANZANA

Omar Hernández Romero, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2014

Los principales estados productores de manzana del país son Chihuahua, Durango, Coahuila y actualmente el estado de Puebla se ha ido posicionando al respecto; en México el consumo de manzanas presenta un crecimiento del 4.9% anual. El moho azul es una pudrición blanda causada por varias especies de *Penicillium* sp. Una de la especies es *Penicillium expansum*, que es el más agresivo y el más comúnmente reportado. *Penicillium* es un género amplio, con al menos 150 especies, muchas de morfología similar; también hay una gran variabilidad dentro de muchas especies, y por lo menos 1.000 fenotipos reconociblemente diferentes pueden llegar a ser catalogados. En el presente trabajo se seleccionaron 118 aislamientos de *Penicillium* sp. durante el año 2013. Para la caracterización morfológica se utilizó los medios PDA y MEA. Se evaluó el color de la colonia en ambos medios, la forma y tamaño de 50 conidióforos, métulas, fiálides y conidios de colonias de 7 días después de la incubación. En general en MEA las colonias fueron de tamaños variables, que van de 20 a 40 mm de diámetro, planas, algunos aislados persistentemente aterciopelado, otros al menos en la parte coremial; micelio con frecuencia enteramente subterráneo; elevada producción de conidios, en PDA las colonias fueron floculosas a fasciculadas, azul verdosas, con pequeños márgenes blancos. Hubo diversidad de formas, tamaños y estructuras entre especies y dentro de especies. La caracterización morfológica arrojó cuatro especies: *P. chrysogenum* (17.9%); *P. expansum* (77.1%) *P. solitum* (2.5 %) al igual que *P. verrucosum*. La PCR confirmó las especies *P. expansum* y *P. chrysogenum* con base en las bandas 590-600 pb y la amplificación de la región interna del genoma ITS (ITS1 e ITS2); se encontró una especie no determinada en la caracterización morfológica, la cual se determinó en NCBI como *P. radicum*.

Palabras clave: *Penicillium expansum*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium radicum*, moho azul, *Malus x domestica*, variación intra e interespecífica, PCR.

MOLECULAR AND MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION *Penicillium* sp. IN APPLE FRUITS.

Omar Hernández Romero, M.Sc.

Colegio de Postgraduados, 2014

The most important states producing apple fruits are Chihuahua, Durango, Coahuila, and recently Puebla State, too. In Mexico apple consumption has increased by 4.9% annually. Blue mold is a soft rot caused by several species of *Penicillium* sp. One of these species is *Penicillium expansum*, and it is the most aggressive and the most commonly reported. *Penicillium* is a wide genus; with at least 150 species, several of them, with a similar morphology. There are a great variability within countless species, as well. At least 1,000 recognizably different phenotypes can become cataloged. In this document, 118 isolates of *Penicillium* sp. were selected, during 2013. To carry out the morphological characterization was used PDA and MEA methods. Colony color was assessed in both methods; the form and size of 50 conidiophores, metulas. fialids, and conidiums of colonies afterwards seven days of incubation. In general, with MEA method, colonies were of variable sizes; between 20 to 40 mm of diameter, flats, some of them velvety; and others, at least in coremial part. Myceliums were found with frequency, entirely underground, high production of conidiums. In PDA, colonies were flocks to fasciculates blue-green, with white small banks. There were diversity of forms, sizes and structures among species and within species. Morphological characterization throws four species: *P. chrysogenum* (17.9%); *P. expansum* (77.1%), *P. solitum* (2.5%), at the same to *P. verrucosum*. PCR method, confirm the species *P. expansum*, and *P. chrysognum* with base in the bands 590-600 pb, and the internal region amplification of genome ITS (ITS1 and ITS2); it was found a specie no certain on morphological characterization, whom was determine in NCBI as *P. radicum*.

Key words: *Penicillium expansum*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium radicum*, blue mold, *Malus x domestic*, intra and interspecific variation, PCR.

INTRODUCCIÓN

De los 31 Estados de la Federación más el Distrito Federal, el manzano se encuentra ubicado en 25 de éstos bajo una diversidad de climas y suelos. Los principales estados productores de manzana del país son Chihuahua, Durango, Coahuila y actualmente el estado de Puebla se ha ido posicionando al respecto; en dichos estados se obtienen los niveles de plantación más elevados del país. El consumo mundial de manzanas entre 1998 y 2000 fue de 47.2 millones de ton (Giacinti, 2002), en México el consumo de manzanas presenta un crecimiento del 4.9% anual (Giacinti, 2003), sin realizar campañas exhaustivas de propaganda y con los precios más altos del mercado en todo el continente Americano. La demanda interna de manzana en México es de aproximadamente el doble de lo que se produce a nivel nacional, por lo que se tiene que recurrir al mercado de importaciones para subsanar esta deficiencia. La producción de manzana en Chihuahua, bajo los sistemas tradicionales de manejo, presentan promedios de cosecha que dependen de factores independientes de las densidades de plantación que actualmente se manejan, pero que están relacionados con los niveles de tecnificación de huertos, cuyos rangos son variables entre y dentro de los mismos (Ramírez *et al.*, 2006).

Para hacer más eficiente la producción de este fruto debemos considerar mitigar los riesgos que conllevan las plagas y enfermedades ya que estas pueden ocasionar enormes pérdidas. Por ejemplo: 40% de flores muertas por tizón de fuego *Erwinia amylovora* (Ramírez-Legarreta *et al.*, 1999); 20% de árboles enfermos por pudriciones de cuello y raíz (*Phytophthora* sp.) (Ramírez-Legarreta y Jacobo-Cuéllar, 2002); del 1.4 a 44% de fruto dañado por palomilla de la manzana (*Cydia pomonella* Linneo) (Jacobo-Cuéllar y Ramírez-Legarreta, 1999); 70% de roseteado en la fruta (Ramírez-Legarreta y Jacobo Cuellar, 1999); y pérdidas del 17% por corazón mohoso *Alternaria alternata* sp. *mali* en el cultivar Red Delicious (Ramírez-Legarreta y Jacobo-Cuéllar, 1999).

El moho azul es una pudrición blanda causada por varias especies de *Penicillium* sp. Una de esas especies es *Penicillium expansum*, que es el más agresivo y el más comúnmente reportado. Otras especies, semejantes además de *P. expansum* que causan estas pudriciones en frutos de manzana en todo el mundo, se mencionan a continuación: *P. chrysogenum* (Domsch *et al.*, 1980), *P. glabrum* (Van der Walt *et al.*, 2010); *P. chermesinum* (Van der Walt *et al.*, 2010); *P. solitum*

(Pienzzola, *et al.*, 2004), (Jones *et al.*, 1990), (Sanderson y Spotts, 1995), (Jurick *et al.*, 2009), (Pitt *et al.*, 1991) y (McEvoy *et al.*, 2006); *P. viridicatum* (Pienzzola, *et al.*, 2004), (Jones *et al.*, 1990) y (Heald y Ruehle, 1931); *P. brevicompactum* (Pienzzola, *et al.*, 2004), (Jones *et al.*, 1990) y (Barkai-Golan, 1974); *P. commune* (Koffmanm, y Penrose 1931); *P. regulosum* (Van der Walt *et al.*, 2010) y (Barkai-Golan, 1974); *P. funiculosum* (Combrink, *et al.*, 1985), (De Kock *et al.*, 1991) y (Serdani, *et al.*, 1998); *P. ramulosum* (Van der Walt *et al.*, 2010); *P. verrucosum* (Heald y Ruehle, 1931); *P. crustosum* (Prusky y Ben-Aire, 1985); *P. diversum* (Borecka, 1977); *P. spinulosum* (Borecka, 1977); *P. dendriticum* (Van der Walt *et al.*, 2010); *P. roquefortii* (Spotts *et al.*, 1988); *P. cecidicola* (Van der Walt *et al.*, 2010).

P. expansum ha mostrado, que produce sobre las manzanas, patulina, una micotoxina mutagénica, inmunotóxica, y neurotóxica (Brause *et al.*, 1996.). Por lo tanto, es importante detectar y minimizar las pudriciones de *P. expansum* en manzanas, en particular las manzanas que tienen como destino la producción de jugos.

Este género de hongos se caracteriza por formar conidios en una estructura ramificada semejante a un pincel que termina en células conidiógenas llamadas fiálides. En la figura 1 se esquematizan los tipos de conidióforos del género *Penicillium*, cuyas ramificaciones se ubican formando verticilos. Si hay sólo un verticilo de fiálides el pincel es monoverticilado. Las ramificaciones de un pincel poliverticilado son, métulas y fiálides. Los conidios generados en fiálides suelen llamarse fialoconidios para indicar su origen. En la fiálide, al dividirse el núcleo, se extiende simultáneamente el extremo apical que luego se estrangula separando a la espora recién formada. Se llama conectivo a la porción de pared que une entre sí a los conidios permitiendo la formación de cadenas, y en algunas especies se aprecia claramente con el microscopio óptico (Webster, 1986).

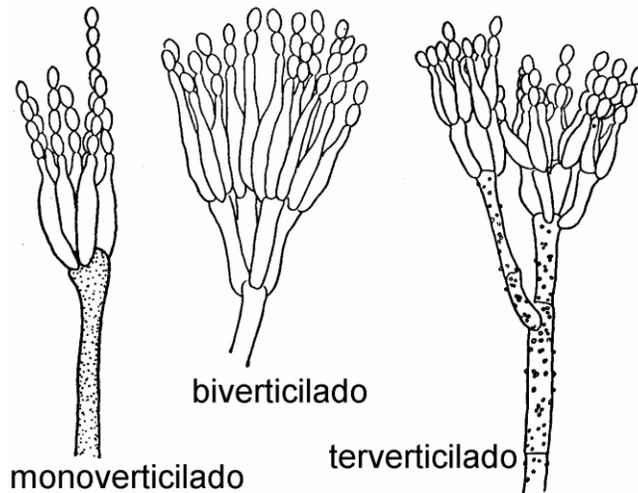


Figura 1. Tipos de conidióforos en el género *Penicillium*.

Penicillium es un género amplio, con al menos 150 especies, muchas de morfología similar (Pitt y Hocking, 1997). También hay una gran variabilidad dentro de muchas especies, y por lo menos 1,000 fenotipos reconociblemente diferentes pueden llegar a ser catalogados. Debido a la variabilidad inherente en el género, sólo del 70 al 80% de los aislados, incluso de fuentes comunes, son fácilmente identificables (Pitt, 1988). Muchas de las claves taxonómicas para identificar *Penicillium* sp. se basan principalmente en criterios morfológicos. La mayoría de ellos es a base de identificación micromorfología, macromorfología y colores producidos en el micelio o en el medio de crecimiento (Ramírez, 1983) y (Raper y Thom, 1949). Sin embargo estos métodos no son muy confiables, ya que son criterios muy variables incluso dentro de la misma especie.

Actualmente la caracterización molecular ha demostrado ser muy útil. Varios métodos para la detección de polimorfismo de ADN en los hongos se han utilizado para detectar la variación intraespecífica e interespecífica en *Penicillium* y otros géneros (Castle *et al.*, 1998), (Chen *et al.*, 1999) y (Dupont *et al.*, 1999). Estos métodos incluyen fragmentos de restricción polimórficos (RFLP), la subunidad ribosomal grande (r) la secuencia de ARN, y el uso de ADN polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD). Estos estudios indican que la sensibilidad y la rapidez de los procedimientos de identificación basados en ADN facilitan en gran medida el desarrollo de métodos de diagnóstico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Durante el año 2013 se colectaron de la central de abastos de la Ciudad de México, frutos de manzana var Golden Delicious provenientes del municipio de Cuauhtémoc, Chihuahua (Figura 2). Se eligieron 38 puntos de venta de los cuales se obtuvieron 5 submuestras de cada uno. De estas muestras y submuestras se eligieron los frutos que presentaron signos y síntomas característicos del patógeno en estudio de los cuales se obtuvieron cultivos puros a partir de la técnica de punta de hifa.



Figura 2. Localización del origen de la fruta muestreada.

Identificación del Agente Causal

La purificación del hongo se llevó a cabo en el laboratorio de patología postcosecha del Programa de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. De los frutos colectados que presentaron la pudrición característica de *Penicillium* sp. se procedió a colocarlos en cámara húmeda (una cámara por cada submuestra) por un periodo de 7 días hasta que algunos frutos manifestaron la esporulación del género (Figura 3 a).

Se sembró la esporulación en cajas petri de 90 x 15 mm con medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar Bioxon (PDA, 39 gL⁻¹ en 1000 ml); se dejó a 23°C ± 1°C por 5 días. Se transfirió

fragmentos de micelio de 5mm de diametro obtenidos con un sacabocados a medio de cultivo con agar bacteriológico Bioxon (2g L^{-1} en 1000 ml) por 8 días a $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (Figura 3 b y c). De las colonias formadas se transfirió por medio de la técnica de punta de hifa a medio PDA; esto para asegurar homogeneidad en las colonias puras (Figura 3 d).

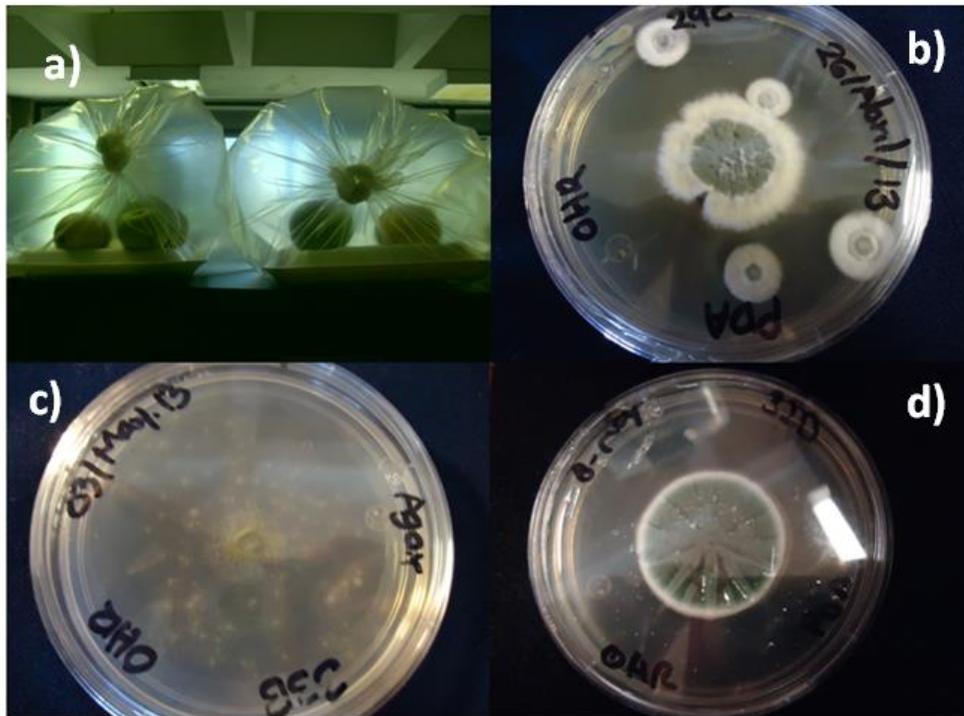


Figura 3. Aislamientos de *Penicillium* sp. a) frutos en cámara húmeda; b) crecimiento en PDA del hongo; c) crecimiento en agar y d) crecimiento del cultivo puro en PDA.

Conidios de colonias puras con 8 días de crecimiento se conservaron en ultracongelación (ultracongelador Thermo Scientific model 700 Series) a -80°C en una solución de 1 ml de glicerol al 20% en tubos eppendorf (Figura 4).



Figura 4. Conservación de las colonias, a) barrido de glicerol en la colonia pura; b) y c) almacenamiento en tubos eppendorf.

En la tabla 1 se enlistan los 118 aislamientos obtenidos; como se puede observar, no se obtuvieron aislados de todos los sitios.

Tabla 1. Aislamientos obtenidos de los muestreos.

No	Aislamiento ¹	Fecha de muestreo	No	Aislamiento ¹	Fecha de muestreo	No	Aislamiento ¹	Fecha de muestreo
1	1A1	12/01/2013	41	8C1	12/01/2013	81	18E2	26/01/2013
2	1A2	12/01/2013	42	8C2	12/01/2013	82	19B1	26/01/2013
3	1B1	12/01/2013	43	8D1	12/01/2013	83	20A1	09/02/2013
4	1B2	12/01/2013	44	8D2	12/01/2013	84	21B1	09/02/2013
5	1B3	12/01/2013	45	9A1	12/01/2013	85	21B2	09/02/2013
6	1C1	12/01/2013	46	9A2	12/01/2013	86	22A1	09/02/2013
7	1C2	12/01/2013	47	9B1	12/01/2013	87	22A2	09/02/2013
8	1D1	12/01/2013	48	9B2	12/01/2013	88	22B1	09/02/2013
9	1D2	12/01/2013	49	9B3	12/01/2013	89	22B2	09/02/2013
10	1D3	12/01/2013	50	11A1	26/01/2013	90	22B3	09/02/2013
11	1D4	12/01/2013	51	11A2	26/01/2013	91	22D1	09/02/2013
12	1E1	12/01/2013	52	12A1	26/01/2013	92	22D2	09/02/2013
13	1E2	12/01/2013	53	12A2	26/01/2013	93	23A1	09/02/2013
14	2R1	12/01/2013	54	12B1	26/01/2013	94	25A1	09/02/2013
15	2D2	12/01/2013	55	12B2	26/01/2013	95	25B1	09/02/2013
16	3B1	12/01/2013	56	12C1	26/01/2013	96	28A1	09/02/2013

17	3B2	12/01/2013	57	12C2	26/01/2013	97	28B1	09/02/2013
18	3C1	12/01/2013	58	12D1	26/01/2013	98	29C1	09/02/2013
19	3C2	12/01/2013	59	12D2	26/01/2013	99	29D2	09/02/2013
20	4R1	12/01/2013	60	12D3	26/01/2013	100	30A1	09/02/2013
21	4A2	12/01/2013	61	12E1	26/01/2013	101	31B1	09/02/2013
22	4B1	12/01/2013	62	12E2	26/01/2013	102	31B2	09/02/2013
23	4C1	12/01/2013	63	12F1	26/01/2013	103	31C1	09/02/2013
24	4C2	12/01/2013	64	12F2	26/01/2013	104	32B1	02/03/2013
25	5_2	12/01/2013	65	14A1	26/01/2013	105	32B2	02/03/2013
26	5D1	12/01/2013	66	14A2	26/01/2013	106	32D1	02/03/2013
27	5D2	12/01/2013	67	14B1	26/01/2013	107	32D2	02/03/2013
28	6A1	12/01/2013	68	14B2	26/01/2013	108	33A1	02/03/2013
29	6A2	12/01/2013	69	15A1	26/01/2013	109	33A2	02/03/2013
30	7R1	12/01/2013	70	15A2	26/01/2013	110	33B1	02/03/2013
31	7A1	12/01/2013	71	17A1	26/01/2013	111	34B1	02/03/2013
32	7A2	12/01/2013	72	17A2	26/01/2013	112	34B2	02/03/2013
33	7B1	12/01/2013	73	17B1	26/01/2013	113	35B1	02/03/2013
34	7B2	12/01/2013	74	17C1	26/01/2013	114	35B2	02/03/2013
35	7C1	12/01/2013	80	18A2	26/01/2013	115	35C2	02/03/2013
36	7C3	12/01/2013	75	18B1	26/01/2013	116	35D2	02/03/2013
37	7C4	12/01/2013	76	18C1	26/01/2013	117	36A1	02/03/2013
38	8A1	12/01/2013	77	18C2	26/01/2013	118	36B1	02/03/2013
39	8A2	12/01/2013	78	18D1	26/01/2013			
40	8B1	12/01/2013	79	18E1	26/01/2013			

¹ Cada número y letra corresponde al lugar de muestreo de la Central de Abastos de la Ciudad de México y a la submuestra respectivamente

Caracterización Morfológica

Aislamientos en ultracongelación (-80°C) se reactivaron colocando 100 µL de la solución de conidios en glicerol al 20% en cajas petri con PDA, se incubaron durante 4 días a 23°C ± 1°C. Se transfirieron discos de 5mm del hongo a medio de cultivo con PDA-Ac. Láctico (100 µL en 1000

ml de medio) para eliminar remanentes de contaminación; se incubó 6 días a $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Para la descripción morfológica se utilizaron las claves de Domsch, *et al.*, (1980), Dictionary of the Fungi (Kirk *et al.*, 2008), la base de datos de MYCOTA (Centre de Recherche Sur la Conservation des Collections) y las claves de Pitt (1988); se consideraron el crecimiento del hongo en medio PDA, Agar-Extracto de malta Difco (MEA 33.6 g L⁻¹ en 1000 ml). Las características que se consideraron fueron: Forma, tamaño y textura de conidios; forma y tamaño del conidióforo, número de verticilios y forma y tamaño de métula y fiálide las medidas se realizaron en portaobjetos con una solución de glicerol al 50% y se observaron en un microscopio de contraste de fases (Olimpus BX41) y un microscopio óptico (Olympus CX31) a 50 conidios, fiálides y métulas de cada aislamiento y se obtuvo la media y la desviación estándar de cada uno.

Caracterización Molecular

Se eligieron 25 aislamientos que tuvieron diferenciación aparente en la caracterización morfológica, y que además pertenecieran a distinto lugar de muestreo, estos aislamientos fueron: 1C1, 3B1, 4C2, 5_2, 7, 8D1, 9A1, 11A1, 12E1, 14A1, 15A1, 17A1, 18A2, 21B1, 22B1, 23A1, 25A1, 28A1, 29C1, 30A1, 31B1, 32B1, 33A1, 34B1, 35B1. Colonias de dichos aislamientos de 14 días de crecimiento a $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ se sometieron a extracción de ADN, reacción en cadena de la polimerasa, purificación y secuenciación para conocer a que especie pertenecen los aislados.

Extracción de ADN

Para la extracción de ácidos nucleicos de los 25 aislamientos, se utilizó el reactivo comercial para ARN de plantas Concert de Invitrogen (Thermo Fisher Scientific Inc.); utilizando la metodología propuesta por la marca comercial Invitrogen en: http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/plantrna_man.pdf y el cual se realizó de la siguiente manera: se colocaron 500 μL de solución de lisis (Concert Plant RNA Purification Reagent) en tubos eppendorf de 1mL. Los micelios y las esporas fueron raspadas de las placas de colonias de 14 días de crecimiento en PDA, se maceraron en morteros estériles y ultracongelados (-70°C) hasta obtener un fino polvo, el cual se depositó en el tubo con la solución de lisis. Se colocó la solución en un agitador vortex (Lab-Line Model 1195) dos veces cada 5 minutos. Se

centrifugó la solución a 13 mil rev. por 2 min (Beckman Coulter Microfuge 22r). Se recuperó el sobrenadante en otro tubo eppendorf y se agregó 100 µL de cloruro de sodio 5M; se mezcló por inmersión de 6 a 8 veces y se aplicaron 300 µL de cloroformo. Se volvió a mezclar por inmersión hasta obtener una mezcla homogénea. La mezcla se centrifugó a 13 mil rev por 10 min. Del producto de la centrifuga se obtuvo el sobrenadante en otro tubo eppendorf y se le agregó 400 µL de isopropanol. Se mantuvo la solución en incubación por 10 min a -20°C; se volvió a centrifugar por 10 min a 13 mil rev. y se eliminó el sobrenadante. El tubo eppendorf se invirtió en una toalla sanita para evaporar a temperatura ambiente los remanentes del sobrenadante; enseguida se colocó 500 µL de etanol al 70% y se volvió a colocar en el agitador vortex para descompactar la madeja de ADN. Se centrifugó la mezcla por 10 min a 13 mil rev., el sobrenadante se eliminó y se mantuvo en temperatura ambiente para evaporar los remanentes de la mezcla. Finalmente se agregó agua ultrapura para PCR (GIBCO, INVITROGEN) a la pastillas con ADN; dependiendo el tamaño de la pastilla se agregó 50, 100 o 150 µL para pastillas pequeñas, medianas y grandes respectivamente (Invitrogen, 2012).

Gel de Integridad de ADN

Para observar la integridad y cantidad de ADN extraído, se realizó un gel de electroforesis de la siguiente manera; una mezcla de agarosa al 0.8% (PROMEGA, 0.3 gr) con una solución de 30 mL de buffer de corrido Tris-acetate-EDTA (INVITROGEN, TAE 1X). Se colocó 3 µL de Broumro de Etidio en una caja de electroforesis (BIO RAD POWER PAC 300) y se vertió la solución de TAE-Agarosa. El peine de la caja de electroforesis se colocó para crear los pocillos donde se colocará el ADN. El gel se solidificó y se procedió a cargar el gel con una solución de 2 µL de cada ADN extraído y 3 µL de buffer de tinción para llenar cada pocito de la caja. Se aforó la caja de electroforesis hasta cubrir el gel con solución buffer TAE 1X. La corrida de electroforesis fue realizada durante 30 min a 90 voltios. El gel se retiró de la caja para ser colocado en un espectrofotómetro (UVP Gel doc It 300) donde se observó la cantidad de ADN.

Reacción en Cadena de la Polimerasa

El ADN de los aislamientos en estudio se amplificó empleando para ello los iniciadores ITS 4 y 5 (ITS 4: 5'- GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G -3'; ITS 5: 5'- TCC TCC GCT TAT

TGA TAT GC -3'). La mezcla de amplificación, con volumen total de 50 μL , según Innis *et al.*, (1990) se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Concentración de la mezcla de amplificación.

	Concentración comercial	Concentración a utilizar	Concentración final
H ₂ O PCR	-----	-----	36.2 μL
Buffer PCR	10 X	1X	5 μL
MgCl ₂	50mM	1.5 mM	1.5 μL
DNTP's	10mM	200 μm	1 μL
ITS4	10 pM/ μL	20 pM	2 μL
ITS5	10 pM/ μL	20 pM	2 μL
TAQPolimerasa	5U/ μL	1.5 U	0.3 μL
DNA	-----	2 mL	2 μL
TOTAL	-----	-----	50 μL

La reacción de amplificación se realizó en un termociclador (BIO RAD C 1000) con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95°C por 5 min; alineamiento y extensión a 95°C por 1 min y 72 °C por 1 min respectivamente; estos ciclos se repitieron 30 veces y finalmente una extensión final de 72°C por 12 min.

El producto de PCR se secuenció en la empresa MACROGEN INC. (Seoul, Corea). Las secuencias fueron comparadas usando la herramienta BLAST en NCBI. Se alinearon las secuencias de los aislamientos utilizados. Las secuencias se compararon por UPGMA usando el programa MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013) y así obtener el dendrograma de los aislados.

Microscopia Electrónica de Barrido

Se prepararon medio de cultivo Agar-PDA en una concentración 1:1 para evitar que las colonias de *Penicillium* sp. crezcan muy compactas y eviten una buena observación en el microscopio; se eligieron 5 cepas para esta prueba (17-A1, 18-A2, 35-B1, 5-2 y 14-A1). Se cortaron 5 fragmentos de medio con el cultivo los aislados de 3 días de crecimiento, para la observación de conidios y estructuras del características del género, dichas muestras se fijaron en glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de fosfatos Sorensen's 0.1M pH 7.2 (Bozzola y Rusell) durante 12 hr. Posteriormente se realizaron tres lavados seriados con amortiguador de fosfatos antes mencionado, un minuto en cada cambio. Los fragmentos se deshidrataron en una serie de etanoles graduales (30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 90%) por 45 min en cada concentración. En el alcohol al 100 % se vertió 3 veces por 20 minutos en cada cambio. Las muestras se secaron en una secadora de punto crítico (Sandri-780A), se colocaron y orientaron sobre portamuestras usando una cinta doble adhesiva de carbón y se recubrieron con oro durante 5 minutos en una ionizadora (Ion Sputter JFC-1100, Jeol, Fine Coat).

Las muestras se observaron y tomaron las micrografías en un Microscopio Electrónico de Barrido (JEOL JSM 6390) a 10 Kv.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación del Patógeno

De los frutos con signos y síntomas observados en muestras al microscopio, se observó la producción de fiálide, métula y conidios hialinos unicelulares. Se identificó el género acorde con Pitt (1988). En los frutos se presentó la pudrición blanda color marrón a café con esporulación azul-verdosa y un olor fétido característicos del ataque de *Penicillium* sp. (Figura 5).

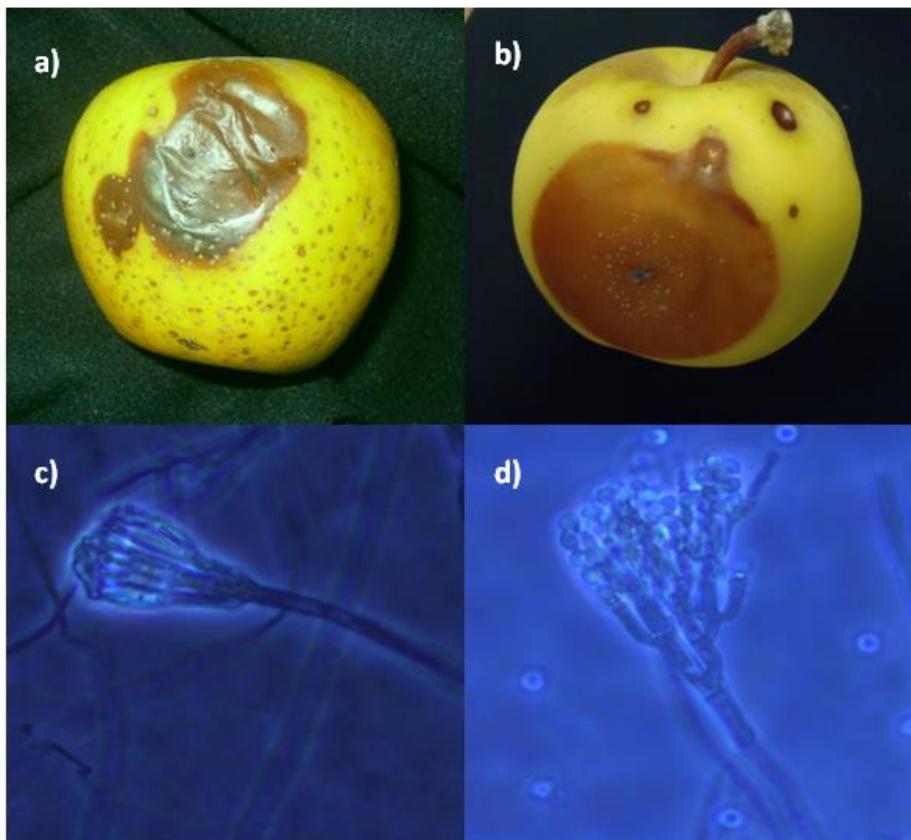


Figura 5. *Penicillium* sp. en frutos de manzana a) fruto con pudrición blanda color marrón; b) fruto con esporulación verdosa; c) estructura característica del genero *Penicillium* d) cadena de conidios sobre fiálide y métula.

Caracterización Morfológica

Para la descripción morfológica se utilizaron las claves de Domsch, *et al.*, (1980), Dictionary of the Fungi (Kirk *et al.*, 2008), la base de datos de MYCOTA (Centre de Recherche Sur la Conservation des Collections) y las claves de Pitt (1988); dichas claves describen la necesidad de medios de cultivos específicos para realizar la caracterización morfológica e identificar la especie en estudio.

Se utilizó medio Agar-Extracto de malta (MEA) donde se pudo observar una gran variedad de formas, colores y diámetros de crecimiento; lo anterior concuerda con Pitt (1988), Frisvad (1981), Frisvad y Filtenborg, (1983) y Pianzola *et al.*, (2004) que han demostrado que algunas de estas características morfológicas (por ejemplo, la textura de las colonias) son muy variables y que los criterios morfológicos no permiten siempre una clasificación exacta. En general el crecimiento en MEA (Figura 6) las colonias fueron de tamaños variables, que van de 20 a 40 mm de diámetro, planas, algunos aislados persistentemente aterciopelados, otros al menos en la parte central; micelio con frecuencia enteramente subterráneo; producción de conidios generalmente bastante, lo cual coincidió como lo describen Pitt y Hocking (2009). En PDA las colonias fueron floculosas a fasciculadas, azul verdosas, con pequeños márgenes blancos (Figura 7).

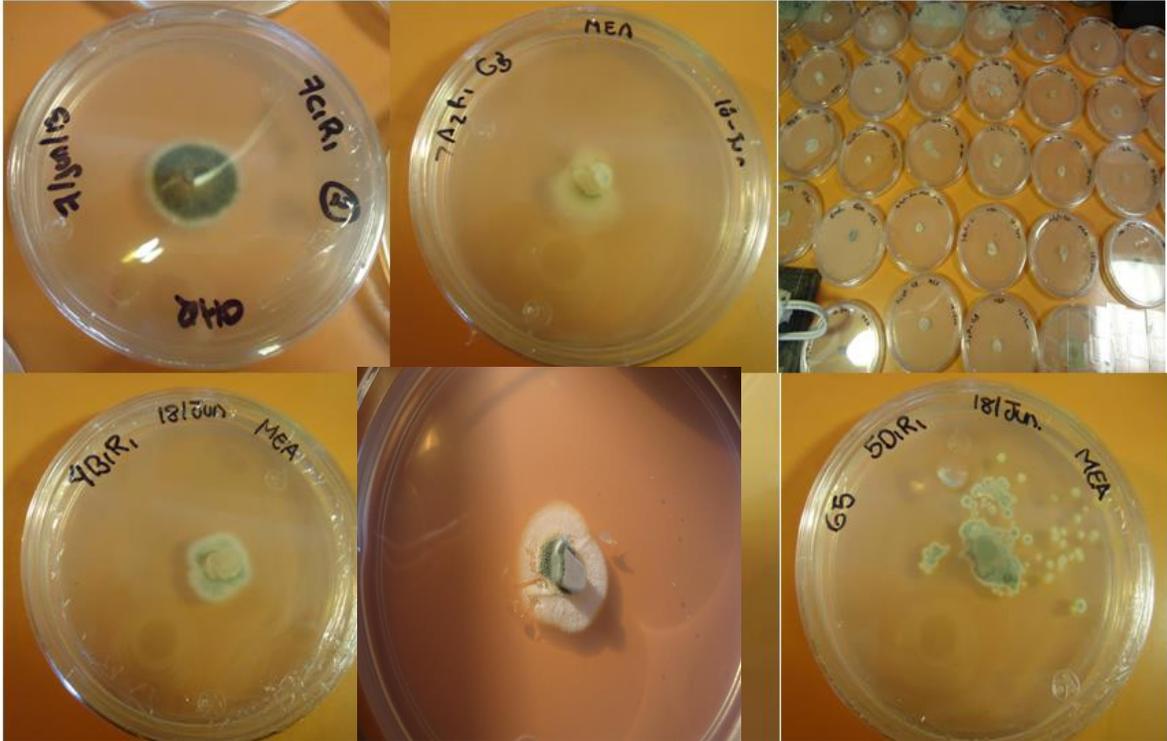


Figura 6. Diversidad de texturas y colores de colonias de *Penicillium* sp. en MEA.



Figura 7. Crecimiento en PDA de *Penicillium* sp.

Medición de las estructuras de los hongos

Medición del conidióforo

Una de las estructuras claves para la determinación de especies del género *Penicillium* es el conidióforo (Domsch *et al.*, 1980). En la tabla 3 se muestra las medidas y número de verticilio de cada uno de los aislamientos en estudio.

Tabla 3. Forma, tamaño y divisiones del conidióforo de los aislamientos de *Penicillium* sp.

AISL I	CONIDIOFORO				AISL I	CONIDIOFORO				AISL I	CONIDIOFORO			
	ML	BL	TL	LONG.		ML	BL	TL	LONG.		ML	BL	TL	LONG.
	a	b	c	(μ m)		a	b	c	(μ m)		a	b	c	(μ m)
1A1	0	0	1	450 \pm 8.6	8C1	0	0	1	478 \pm 8.8	18E1	1	0	0	270 \pm 3.8
1A2	0	0	1	510 \pm 19.8	8C2	0	0	1	456 \pm 16.6	18E2	0	0	1	560 \pm 20.8
1B1	0	1	0	250 \pm 5.5	8D1	1	0	0	240 \pm 9.6	19B1	0	0	1	450 \pm 5.9
1B2	0	0	1	430 \pm 7.8	8D2	1	0	0	200 \pm 7.2	20A1	0	0	1	530 \pm 19.9
1B3	0	1	0	350 \pm 8.6	9A1	0	0	1	436 \pm 20.8	21B1	0	0	1	470 \pm 4.2
1C1	1	0	0	235 \pm 12.6	9A2	1	0	0	250 \pm 9.6	21B2	0	0	1	468 \pm 9.3
1C2	1	0	0	245 \pm 15.7	9B1	1	0	0	285 \pm 12.6	22A1	0	0	1	510 \pm 20.1
1D1	0	0	1	480 \pm 9.6	9B2	1	0	0	270 \pm 8.5	22A2	0	0	1	507 \pm 9.9
1D2	0	1	0	280 \pm 8.9	9B3	1	0	0	275 \pm 3.7	22B1	0	0	1	420 \pm 16.7
1D3	0	0	1	470 \pm 8.7	11A1	1	0	0	250 \pm 7.5	22B2	0	0	1	420 \pm 3.7
1D4	0	0	1	440 \pm 10.5	11A2	1	0	0	200 \pm 3.7	22B3	0	0	1	459 \pm 4.8
1E1	0	0	1	400 \pm 5.7	12A1	0	0	1	500 \pm 35.5	22D1	0	0	1	540 \pm 20.8
1E2	1	0	0	210 \pm 7.5	12A2	0	0	1	499 \pm 20.0	22D2	0	0	1	450 \pm 5.9
2R1	0	0	1	470 \pm 4.6	12B1	0	0	1	409 \pm 13.6	23A1	1	0	0	250 \pm 6.8
2D2	0	0	1	450 \pm 8.8	12B2	0	0	1	530 \pm 14.7	25A1	0	0	1	439 \pm 9.4
3B1	0	0	1	478 \pm 10.5	12C1	0	0	1	479 \pm 18.7	25B1	0	0	1	456 \pm 20.7
3B2	0	0	1	525 \pm 18.6	12C2	0	0	1	450 \pm 3.7	28A1	0	0	1	415 \pm 5.9
3C1	0	0	1	479 \pm 12.5	12D1	0	0	1	530 \pm 30.6	28B1	0	0	1	490 \pm 10
3C2	0	0	1	450 \pm 13.6	12D2	0	0	1	520 \pm 10.8	29C1	0	0	1	430 \pm 23.6
4R1	0	0	1	530 \pm 4.7	12D3	0	0	1	457 \pm 18.7	29D2	0	0	1	520 \pm 29.7
4A2	0	0	1	467 \pm 20.5	12E1	1	0	0	236 \pm 4.7	30A1	0	0	1	450 \pm 27.8
4B1	0	0	1	435 \pm 4.5	12E2	1	0	0	255 \pm 8.8	31B1	0	0	1	420 \pm 9.4
4C1	0	0	1	465 \pm 12.6	12F1	0	0	1	451 \pm 12.5	31B2	0	0	1	467 \pm 15.8

4C2	0	1	0	390 ± 15.7	12F2	0	0	1	435 ± 4.7	31C1	0	0	1	405 ± 8.4
5_2	0	1	0	380 ± 8.7	14A1	0	0	1	410 ± 3.6	32B1	0	0	1	439 ± 4.9
5D1	0	0	1	458 ± 15.0	14A2	0	0	1	490 ± 7.9	32B2	0	0	1	426 ± 3.6
5D2	1	0	0	290 ± 10.7	14B1	0	0	1	487 ± 16.0	32D1	0	0	1	435 ± 8.5
6A1	0	0	1	430 ± 20.5	14B2	0	0	1	532 ± 26.8	32D2	0	0	1	485 ± 9.4
6A2	0	0	1	455 ± 8.7	15A1	0	0	1	490 ± 4.8	33A1	0	0	1	430 ± 20.0
7R1	1	0	0	265 ± 8.5	15A2	0	0	1	420 ± 19.9	33A2	0	0	1	455 ± 3.8
7A1	1	0	0	240 ± 14.6	17A1	0	0	1	520 ± 10.8	33B1	0	0	1	435 ± 9.6
7A2	0	1	0	260 ± 8.3	17A2	0	0	1	450 ± 34.5	34B1	0	0	1	480 ± 17.8
7B1	0	0	1	460 ± 10.9	17B1	0	0	1	516 ± 28.9	34B2	0	0	1	505 ± 39.7
7B2	0	0	1	415 ± 6.9	17C1	0	0	1	550 ± 30.8	35B1	0	0	1	400 ± 18.6
7C1	0	0	1	476 ± 20.8	18A2	1	0	0	290 ± 13.5	35B2	0	0	1	410 ± 4.8
7C3	0	0	1	480 ± 16.8	18B1	0	0	1	409 ± 3.7	35C2	0	0	1	450 ± 23.6
7C4	0	0	1	457 ± 6.8	18C1	0	0	1	469 ± 17.8	35D2	0	0	1	415 ± 3.7
8A1	0	0	1	420 ± 12.5	18C2	1	0	0	245 ± 3.8	36A1	0	0	1	520 ± 3.7
8A2	0	0	1	497 ± 19.7	18D1	1	0	0	280 ± 10.7	36B1	0	0	1	510 ± 16.6
8B1	0	0	1	468 ± 9.9										

¹Aislamiento

^a Monoverticilado Liso (0= ausencia; 1= presente)

^b Biverticilado Liso (0= ausencia; 1= presente)

^c Terverticilado Liso (0= ausencia; 1= presente)

Medición de conidios

De todos los aislamientos de *Penicillium* sp. de frutos de manzana; el 100% presentó cadenas de conidios y sin ramificación lo cual es característico del género (Pitt, 1988). En la tabla 4 se muestran las características de los conidios de los 118 aislamientos.

Tabla 4. Superficie, forma y diámetros de conidios.

AISL ¹	X ²	Y ³	DIAM ⁴ (µm)	AISL ¹	X ²	Y ³	DIAM ⁴ (µm)	AISL ¹	X ²	Y ³	DIAM ⁴ (µm)
1A1	L	E	2.5 ± 0.11	8C1	L	E	3 ± 0.15	18E1	L	E	4 ± 0.35
1A2	L	E	2.5 ± 0.35	8C2	L	E	2.5 ± 0.14	18E2	L	E	2.5 ± 0.37
1B1	L	E-S	4.5 ± 0.71	8D1	L	E	4 ± 0.25	19B1	L	E	2.5 ± 0.27
1B2	L	E	2.5 ± 0.23	8D2	L	E	4 ± 0.11	20A1	L	E	2.5 ± 0.13
1B3	L	E-S	3.3 ± 0.26	9A1	L	E	3.75 ± 0.33	21B1	L	E	2.7 ± 0.27
1C1	L	E	4 ± 0.54	9A2	L	E	4 ± 0.32	21B2	L	E	2.7 ± 0.25
1C2	L	E	3.25 ± 0.33	9B1	L	E	3 ± 0.28	22A1	L	E	2.5 ± 0.23

1D1	L	E	2.5 ± 0.26	9B2	L	E	3 ± 0.14	22A2	L	E	2.5 ± 0.19
1D2	L	E-S	3.75 ± 0.41	9B3	L	E	3 ± 0.18	22B1	L	E	3 ± 0.16
1D3	L	E	3 ± 0.56	11A1	L	E	3 ± 0.17	22B2	L	E	3 ± 0.28
1D4	L	E	3 ± 0.45	11A2	L	E	3 ± 0.23	22B3	L	E	2.6 ± 0.23
1E1	L	E	2.8 ± 0.34	12A1	L	E	2.5 ± 0.26	22D1	L	E	2.7 ± 0.09
1E2	L	E	3 ± 0.29	12A2	L	E	2.5 ± 0.29	22D2	L	E	2.5 ± 0.10
2R1	L	E	2.5 ± 0.21	12B1	L	E	2.5 ± 0.18	23A1	L	E	3.8 ± 0.31
2D2	L	E	2.5 ± 0.23	12B2	L	E	2.5 ± 0.11	25A1	L	E	2.6 ± 0.30
3B1	L	E	2.5 ± 0.26	12C1	L	E	2.5 ± 0.10	25B1	L	E	2.5 ± 0.28
3B2	L	E	3 ± 0.34	12C2	L	E	2.5 ± 0.26	28A1	L	E	2.8 ± 0.16
3C1	L	E	2.5 ± 0.25	12D1	L	E	2.7 ± 0.22	28B1	L	E	2.5 ± 0.17
3C2	L	E	2.5 ± 0.30	12D2	L	E	2.6 ± 0.10	29C1	L	E	2.5 ± 0.23
4R1	L	E	2.5 ± 0.21	12D3	L	E	2.5 ± 0.17	29D2	L	E	2.5 ± 0.28
4A2	L	E	2.5 ± 0.10	12E1	L	E	3.2 ± 0.28	30A1	L	E	2.9 ± 0.31
4B1	L	E	2.5 ± 0.19	12E2	L	E	3.5 ± 0.29	31B1	L	E	2.7 ± 0.30
4C1	L	E	2.6 ± 0.20	12F1	L	E	2.6 ± 0.16	31B2	L	E	2.6 ± 0.28
4C2	L	E-S	3 ± 0.24	12F2	L	E	3 ± 0.23	31C1	L	E	2.6 ± 0.25
5_2	L	E-S	3 ± 0.38	14A1	L	E	2.7 ± 0.25	32B1	L	E	2.5 ± 0.15
5D1	L	E	2.8 ± 0.30	14A2	L	E	2.7 ± 0.26	32B2	L	E	2.7 ± 0.35
5D2	L	E	2.5 ± 0.26	14B1	L	E	2.8 ± 0.37	32D1	L	E	2.5 ± 0.28
6A1	L	E	2.6 ± 0.18	14B2	L	E	2.8 ± 0.20	32D2	L	E	2.7 ± 0.13
6A2	L	E	2.5 ± 0.23	15A1	L	E	2.5 ± 0.10	33A1	L	E	2.4 ± 0.21
7R1	L	E	3 ± 0.30	15A2	L	E	2.5 ± 0.15	33A2	L	E	2.5 ± 0.36
7A1	L	E	3 ± 0.22	17A1	L	E	2.5 ± 0.27	33B1	L	E	2.6 ± 0.18
7A2	L	E-S	3.75 ± 0.23	17A2	L	E	2.5 ± 0.38	34B1	L	E	2.8 ± 0.26
7B1	L	E	2.6 ± 0.16	17B1	L	E	2.6 ± 0.24	34B2	L	E	2.5 ± 0.34
7B2	L	E	2.6 ± 0.23	17C1	L	E	2.7 ± 0.20	35B1	L	E	2.7 ± 0.15
7C1	L	E	3.6 ± 0.34	18A2	L	E	3.25 ± 0.19	35B2	L	E	2.5 ± 0.26
7C3	L	E	2.5 ± 0.27	18B1	L	E	2.6 ± 0.23	35C2	L	E	2.8 ± 0.42
7C4	L	E	2.5 ± 0.14	18C1	L	E	2.8 ± 0.30	35D2	L	E	2.7 ± 0.14
8A1	L	E	2.8 ± 0.10	18C2	L	E	4.2 ± 0.28	36A1	L	E	2.9 ± 0.22
8A2	L	E	2.7 ± 0.19	18D1	L	E	4.2 ± 0.16	36B1	L	E	2.6 ± 0.35
8B1	L	E	3.7 ± 0.21								

¹Aislamiento

²X= Superficie del conidio

L= lisa

R=rugosa

³Y= Forma del conidio

E=elíptica

S=subglobosa

E-S= elíptica a subglobosa

⁴DIAM= Diámetro del conidio

Medición de Fiálide y Métula

En la tabla 5 podemos observar la longitud de la métula y de la fiálide de cada uno de los aislamientos de *Penicillium* sp.

Tabla 5. Longitud de fiálide y métula.

AISL ¹	X ² (μm)	Y ³ (μm)	AISL ¹	X ² (μm)	Y ³ (μm)	AISL ¹	X ² (μm)	Y ³ (μm)
1A1	9.7 ± 0.36	10.5 ± 0.22	8C1	9 ± 0.32	11.4 ± 0.19	18E1	7.9 ± 0.32	11.6 ± 0.28
1A2	9 ± 0.22	12.4 ± 0.34	8C2	9.5 ± 0.45	10.3 ± 0.39	18E2	9.3 ± 0.34	10.3 ± 0.28
1B1	SD	SD	8D1	8.3 ± 0.45	8.4 ± 0.29	19B1	10 ± 0.29	11.3 ± 0.17
1B2	10 ± 0.45	11.1 ± 0.26	8D2	9.3 ± 0.39	8.3 ± 0.43	20A1	9.5 ± 0.22	11.4 ± 0.32
1B3	SD	SD	9A1	9.5 ± 0.21	11.8 ± 0.29	21B1	9.2 ± 0.39	10.8 ± 0.37
1C1	8.4 ± 0.34	9.2 ± 0.30	9A2	8.4 ± 0.29	9.3 ± 0.22	21B2	9.5 ± 0.36	10.3 ± 0.20
1C2	7.9 ± 0.26	8.9 ± 0.47	9B1	9.3 ± 0.45	10.1 ± 0.39	22A1	10 ± 0.45	11.5 ± 0.40
1D1	10.3 ± 0.25	10.3 ± 0.33	9B2	7.9 ± 0.33	11.3 ± 0.43	22A2	9.7 ± 0.39	11.4 ± 0.28
1D2	SD	SD	9B3	10.1 ± 0.29	12.3 ± 0.37	22B1	9.5 ± 0.22	12.5 ± 0.35
1D3	9.6 ± 0.35	11.7 ± 0.32	11A1	9.3 ± 0.35	10.4 ± 0.32	22B2	9.6 ± 0.46	12.1 ± 0.34
1D4	9.5 ± 0.37	12 ± 0.38	11A2	8.6 ± 0.29	11.1 ± 0.47	22B3	9.3 ± 0.32	10.4 ± 0.21
1E1	9.8 ± 0.28	10.5 ± 0.26	12A1	9.3 ± 0.14	10.4 ± 0.28	22D1	9.4 ± 0.29	11.5 ± 0.29
1E2	10.2 ± 0.28	11.3 ± 0.39	12A2	9.5 ± 0.22	10.5 ± 0.29	22D2	10 ± 0.56	11.4 ± 0.42
2R1	10.1 ± 0.45	11.3 ± 0.29	12B1	10.1 ± 0.28	11.4 ± 0.20	23A1	9.4 ± 0.26	12.3 ± 0.18
2D2	10.7 ± 0.56	10.4 ± 0.27	12B2	10.4 ± 0.37	10.3 ± 0.18	25A1	9.5 ± 0.56	11.4 ± 0.59
3B1	9.3 ± 0.45	11.4 ± 0.39	12C1	10.5 ± 0.38	10.4 ± 0.25	25B1	9 ± 0.32	10.5 ± 0.21
3B2	9.8 ± 0.34	10.8 ± 0.37	12C2	9.9 ± 0.34	12.5 ± 0.32	28A1	9.3 ± 0.46	10.4 ± 0.38
3C1	9.1 ± 0.32	12.4 ± 0.33	12D1	9.5 ± 0.23	11.9 ± 0.39	28B1	9.3 ± 0.32	10.1 ± 0.27
3C2	9.2 ± 0.39	10.7 ± 0.32	12D2	9.5 ± 0.21	11.5 ± 0.40	29C1	9.4 ± 0.28	10.2 ± 0.40
4R1	10 ± 0.46	10.3 ± 0.28	12D3	9 ± 0.21	11.1 ± 0.21	29D2	9.2 ± 0.26	12.4 ± 0.32
4A2	10.5 ± 0.45	10.8 ± 0.29	12E1	9.4 ± 0.32	8.3 ± 0.23	30A1	9.9 ± 0.36	11.2 ± 0.26
4B1	10.5 ± 0.34	10.8 ± 0.40	12E2	10.3 ± 0.29	9.2 ± 0.29	31B1	9.8 ± 45	12.4 ± 0.24
4C1	9.8 ± 0.21	10.2 ± 0.36	12F1	9.6 ± 0.39	11.9 ± 0.27	31B2	10.4 ± 0.34	11.4 ± 0.35
4C2	SD	SD	12F2	9.1 ± 0.45	10.4 ± 0.26	31C1	10 ± 0.59	10.3 ± 0.46
5_2	SD	SD	14A1	9.3 ± 0.23	11.3 ± 0.18	32B1	10 ± 0.36	10.5 ± 0.19
5D1	9 ± 0.22	11.3 ± 0.32	14A2	9.2 ± 0.35	11.7 ± 0.25	32B2	9.2 ± 0.43	10.6 ± 0.37
5D2	9.4 ± 0.38	12.1 ± 0.45	14B1	9.8 ± 0.23	10.4 ± 0.24	32D1	9.7 ± 0.23	10.3 ± 0.26
6A1	9.7 ± 0.32	11.4 ± 0.48	14B2	10 ± 0.48	11.9 ± 0.39	32D2	9.4 ± 0.46	11.3 ± 0.23
6A2	9.6 ± 0.45	11.3 ± 0.37	15A1	9.1 ± 0.37	10.5 ± 0.41	33A1	9.2 ± 0.37	11.6 ± 0.18
7R1	10.5 ± 0.20	11.3 ± 0.49	15A2	10.5 ± 0.56	12.1 ± 0.35	33A2	9.5 ± 0.22	11.4 ± 0.26

7A1	8.5 ± 0.39	9.1 ± 0.32	17A1	10.6 ± 0.37	10.4 ± 0.27	33B1	9 ± 0.25	12.1 ± 0.14
7A2	SD	SD	17A2	9.4 ± 0.49	11.6 ± 0.26	34B1	9.3 ± 0.29	12.6 ± 0.21
7B1	10.4 ± 0.32	11.5 ± 0.38	17B1	9.7 ± 0.38	11.5 ± 0.32	34B2	9.4 ± 0.33	11.8 ± 0.39
7B2	9.9 ± 0.29	12.4 ± 0.39	17C1	9.4 ± 0.58	12.1 ± 0.26	35B1	9.8 ± 0.23	11.6 ± 0.42
7C1	9.5 ± 0.30	10.4 ± 0.21	18A2	9.4 ± 0.48	11.3 ± 0.29	35B2	10.5 ± 0.26	11.5 ± 0.37
7C3	9.4 ± 0.43	11.5 ± 0.28	18B1	9.4 ± 0.38	10.1 ± 0.30	35C2	10 ± 0.45	12.4 ± 0.51
7C4	9.8 ± 0.28	11.4 ± 0.37	18C1	9.6 ± 0.46	10.2 ± 0.18	35D2	9.1 ± 0.29	10.3 ± 0.12
8A1	10.3 ± 0.33	11.9 ± 0.28	18C2	8.4 ± 0.32	11.2 ± 0.35	36A1	9.5 ± 0.30	11.4 ± 0.28
8A2	10 ± 0.32	10.3 ± 0.34	18D1	8.3 ± 0.29	10.9 ± 0.43	36B1	9.4 ± 0.39	12.1 ± 0.39
8B1	9 ± 0.48	10.3 ± 0.21						

¹Aislamiento

²X= Longitud de Fíalide

SD= sin dato

³Y= Longitud de Métula

SD= sin dato

Se conjuntaron todas las características anteriores para llegar diagnosticar la especie de cada una de los aislamientos obtenidos siguiendo las claves antes mencionadas. Dichas especies se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Especies de *Penicillium* sp. obtenidas de frutos de manzana caracterizadas morfológicamente.

AISLAMIENTO	ESPECIE	AISLAMIENTO	ESPECIE	AISLAMIENTO	ESPECIE
1A1	<i>P. expansum</i>	8C1	<i>P. expansum</i>	18E1	<i>P. chrysogenum</i>
1A2	<i>P. expansum</i>	8C2	<i>P. expansum</i>	18E2	<i>P. expansum</i>
1B1	<i>P. solitum</i>	8D1	<i>P. chrysogenum</i>	19B1	<i>P. expansum</i>
1B2	<i>P. expansum</i>	8D2	<i>P. chrysogenum</i>	20A1	<i>P. expansum</i>
1B3	<i>P. verrucosum</i>	9A1	<i>P. expansum</i>	21B1	<i>P. expansum</i>
1C1	<i>P. chrysogenum</i>	9A2	<i>P. chrysogenum</i>	21B2	<i>P. expansum</i>
1C2	<i>P. chrysogenum</i>	9B1	<i>P. chrysogenum</i>	22A1	<i>P. expansum</i>
1D1	<i>P. expansum</i>	9B2	<i>P. chrysogenum</i>	22A2	<i>P. expansum</i>
1D2	<i>P. solitum</i>	9B3	<i>P. chrysogenum</i>	22B1	<i>P. expansum</i>
1D3	<i>P. expansum</i>	11A1	<i>P. chrysogenum</i>	22B2	<i>P. expansum</i>
1D4	<i>P. expansum</i>	11A2	<i>P. chrysogenum</i>	22B3	<i>P. expansum</i>
1E1	<i>P. expansum</i>	12A1	<i>P. expansum</i>	22D1	<i>P. expansum</i>

1E2	<i>P. chrysogenum</i>	12A2	<i>P. expansum</i>	22D2	<i>P. expansum</i>
2R1	<i>P. expansum</i>	12B1	<i>P. expansum</i>	23A1	<i>P. chrysogenum</i>
2D2	<i>P. expansum</i>	12B2	<i>P. expansum</i>	25A1	<i>P. expansum</i>
3B1	<i>P. expansum</i>	12C1	<i>P. expansum</i>	25B1	<i>P. expansum</i>
3B2	<i>P. expansum</i>	12C2	<i>P. expansum</i>	28A1	<i>P. expansum</i>
3C1	<i>P. expansum</i>	12D1	<i>P. expansum</i>	28B1	<i>P. expansum</i>
3C2	<i>P. expansum</i>	12D2	<i>P. expansum</i>	29C1	<i>P. expansum</i>
4R1	<i>P. expansum</i>	12D3	<i>P. expansum</i>	29D2	<i>P. expansum</i>
4A2	<i>P. expansum</i>	12E1	<i>P. chrysogenum</i>	30A1	<i>P. expansum</i>
4B1	<i>P. expansum</i>	12E2	<i>P. chrysogenum</i>	31B1	<i>P. expansum</i>
4C1	<i>P. expansum</i>	12F1	<i>P. expansum</i>	31B2	<i>P. expansum</i>
4C2	<i>P. verrucosum</i>	12F2	<i>P. expansum</i>	31C1	<i>P. expansum</i>
5_2	<i>P. verrucosum</i>	14A1	<i>P. expansum</i>	32B1	<i>P. expansum</i>
5D1	<i>P. expansum</i>	14A2	<i>P. expansum</i>	32B2	<i>P. expansum</i>
5D2	<i>P. chrysogenum</i>	14B1	<i>P. expansum</i>	32D1	<i>P. expansum</i>
6A1	<i>P. expansum</i>	14B2	<i>P. expansum</i>	32D2	<i>P. expansum</i>
6A2	<i>P. expansum</i>	15A1	<i>P. expansum</i>	33A1	<i>P. expansum</i>
7R1	<i>P. chrysogenum</i>	15A2	<i>P. expansum</i>	33A2	<i>P. expansum</i>
7A1	<i>P. chrysogenum</i>	17A1	<i>P. expansum</i>	33B1	<i>P. expansum</i>
7A2	<i>P. solitum</i>	17A2	<i>P. expansum</i>	34B1	<i>P. expansum</i>
7B1	<i>P. expansum</i>	17B1	<i>P. expansum</i>	34B2	<i>P. expansum</i>
7B2	<i>P. expansum</i>	17C1	<i>P. expansum</i>	35B1	<i>P. chrysogenum</i>
7C1	<i>P. expansum</i>	18A2	<i>P. chrysogenum</i>	35B2	<i>P. expansum</i>
7C3	<i>P. expansum</i>	18B1	<i>P. expansum</i>	35C2	<i>P. expansum</i>
7C4	<i>P. expansum</i>	18C1	<i>P. expansum</i>	35D2	<i>P. expansum</i>
8A1	<i>P. expansum</i>	18C2	<i>P. chrysogenum</i>	36A1	<i>P. expansum</i>
8A2	<i>P. expansum</i>	18D1	<i>P. chrysogenum</i>	36B1	<i>P. expansum</i>
8B1	<i>P. expansum</i>				

De los 118 aislamientos 21 pertenecen a *P. chrysogenum* lo que representa el 17.9%; *P. expansum* obtuvo 91 aislamientos que son el 77.1% de los aislados; tres aislamientos se identificaron con *P. solitum* que simboliza el 2.5 % al igual que *P. verrucosum*.

Los tamaños y formas de las estructuras de cada especie son muy variadas y se superpone con las dimensiones de otras especies, por ejemplo la longitud del conidióforo de *P. chrisogenum* y *P. solitum* oscilan en el mismo rango (200-300µm), su fiálide de 7 a 12 µm y 6.3 a 10 µm respectivamente; la métula de 8 a 12 µm y 8 a 13 µm respectivamente y el diámetro del conidio también es similar en ambas especies. Lo anterior recae en un traslape de dimensiones por lo que es difícil obtener un diagnóstico exacto a nivel de especie con solo estas características tal y como lo describen Van der Walt *et al.*, (2010), Pitt, (1988), Frisvad (1981) y Frisvad y Filtenborg, (1983). Por otra parte los trabajos de Pianzzola *et al.*, (2004) mostraron que la mayoría de sus pruebas en la caracterización morfológica mostraron diversidad entre cepas dentro de una especie y, por lo tanto, no se podía utilizar para la identificación de especies. Además como se mencionó anteriormente, los colores, diámetros y formas de las colonias en PDA y MEA tienen una variación intra e interespecífica.

Algunos autores hacen referencia en que los criterios fisiológicos también se deben considerar en la identificación de estas especies (Pitt, 1988). Asimismo Frisvad (1981), Paterson, *et al.*, (1994) y Pitt (2009) han usado el crecimiento en nitrito o creatina como una única fuente de nitrógeno o el crecimiento en presencia de ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido propiónico, ácido sórbico, y benzoico para la identificación de especies. Además, Pitt (1988) (2009) usa el diámetro de las colonias a temperaturas seleccionadas y diferentes medios para separar secciones, series, y especies del género *Penicillium*.

El perfil de metabolitos secundarios, la detección de la actividad enzimática específica y los patrones electroforéticos de isoenzimas también han sido utilizados para identificar a *Penicillium* sp. (Frisvad y Filtenborg, 1983) y (Jiménez *et al.*, 1990). Aunque es de gran utilidad, la identificación morfológica implica un conjunto de diferentes pruebas que requieren mucho tiempo y labor intensiva. Esto representa un gran inconveniente para la identificación de especies porque, además, todos los ensayos morfológicos son dependientes de la expresión de genes.

Microscopia Electrónica de Barrido

La fidelidad del microscopio electrónico de barrido, suministró una mejor visión de las estructuras del genero *Penicillium*, las cuales se observan en la Figura 8; por otra parte se

presentan estructuras de diversas dimensiones; esto puede ser debido al medio de cultivo donde se obtuvieron las muestras para esta actividad; lo que coincide con lo reportado por Domsch *et al.*, (1980) y Pitt (1988) que mencionan que el medio de cultivo ideal para obtener las estructuras que se ajusten a la mayoría de las claves es Agar-Extracto de malta.

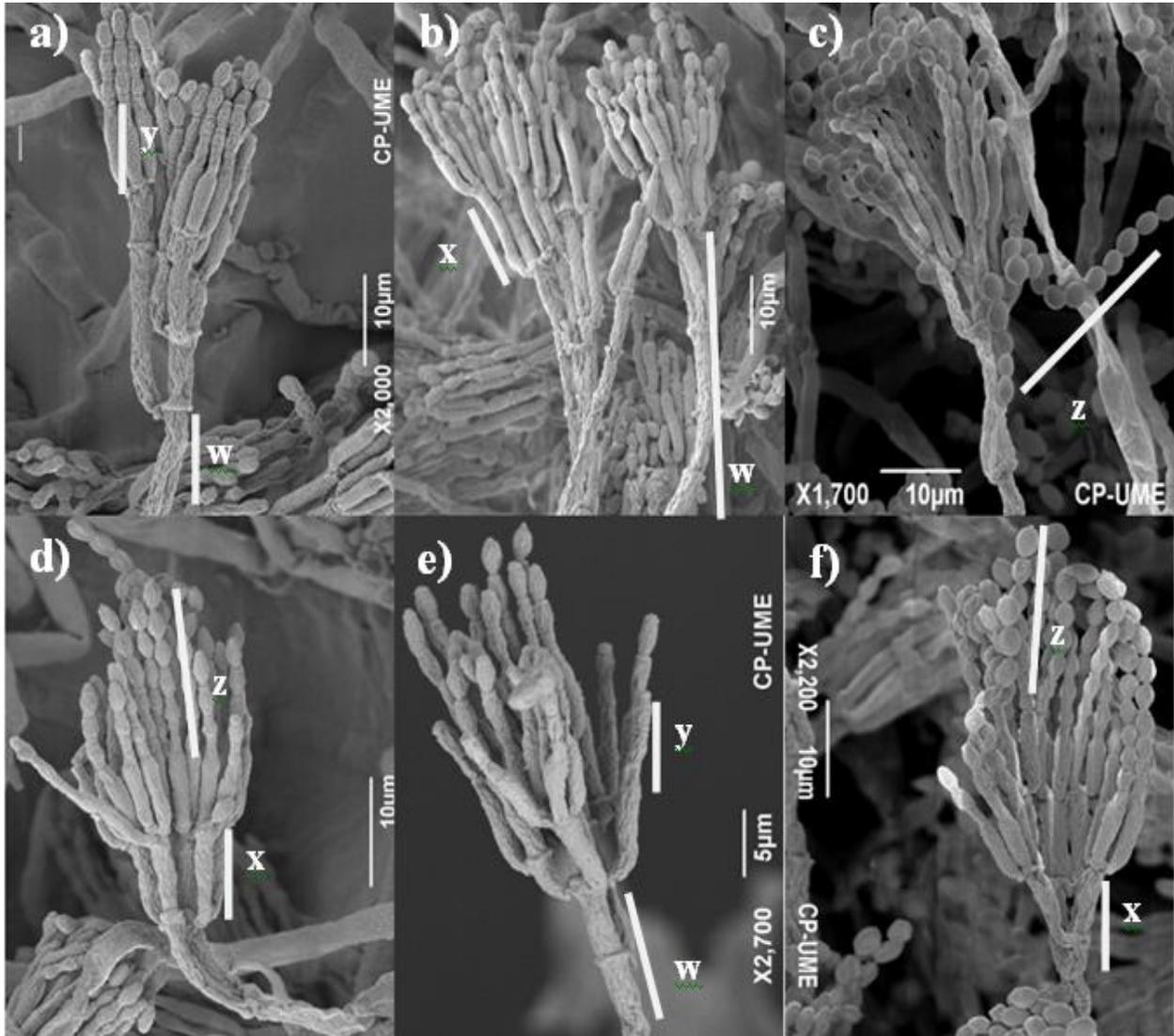


Figura 8. Estructuras de *Penicillium expansum* con la tecnica de Microscopia de Electrónica Barrido. a) y b) aislamiento 17A1; c) aislamiento 18A2; d) aislamiento 35B1; e) aislamiento 5_2; f) aislamiento 14A1; w: conidióforo, x: métula, y: fiálide, z: cadena de conidios. Créditos Biol. Greta Hanako Rosas Saito. Unidad de Microscopia Electrónica-Colegio de Postgraduados.

Caracterización Molecular

Extracción de ADN

Por medio del método comercial para extracción de ARN de plantas Concert de Invitrogen se obtuvo una concentración amplia de ADN; se observó la cantidad de ADN obtenido por medio de un visualizador de imágenes (espectrofotómetro) tal cual se muestra en la Figura 9. Las pastillas de ADN tuvieron variedad en el tamaño.

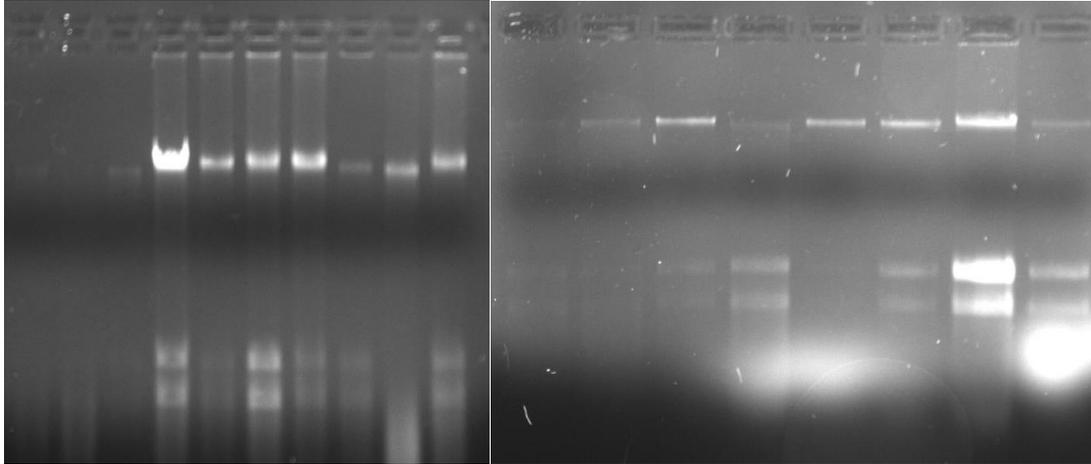


Figura 9. Concentración de ADN obtenido de micelio y esporas de *Penicillium sp.*

Amplificación en Cadena de la Polimerasa

Los productos de PCR amplificados con los primers ITS4 y ITS5 (ITS 4: 5'- GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G -3'; ITS 5: 5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC -3') que cubre la SU 1-5.8S y la región ITS 2 del rDNA de las 25 cepas analizadas tenían un tamaño similar de aproximadamente 600 pb. La aplicación de genotipo (ADN) basados en sistemas podrían superar los inconvenientes de los métodos morfológicos y fisiológicos de identificación taxonómica.

A diferencia del presente trabajo que se utilizó primers universales ITS, Pianzzola *et al.*, (2004) utilizó en su trabajo fragmentos de restricción polimórficos (RFLP) de la región ITS1-ITS2 con dos enzimas y concluyó que la información taxonómica a partir de sus regiones puede dar la información suficiente, pero dicho autor menciona que no es recomendable utilizar estas secuencias como el único criterio para la identificación, lo que concuerda con los trabajos de Boysen *et al.*, (2000). Pianzzola *et al.*, (2004) y Boysen *et al.*, (2000) discuten cada quien en sus trabajos que una mutación puntual podría dar lugar a diferentes perfiles. Por otra parte Van der

Walt *et al.*, (2010) utilizó la misma técnica (RFLP) para los genes de β tubulina de *Penicillium* sp. obteniendo los mismos resultados.

Asimismo la técnica de la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD) utilizada por Pianzola *et al.*, (2004) ofrece una serie de ventajas; el autor menciona que es simple y fácil de realizar, por lo tanto, un gran número de aislados pueden ser analizados en unos pocos días. También es lo bastante sensible para detectar diferencias intra e interespecífica. Pero se debe destacar que varias publicaciones han discutido los problemas de reproducibilidad asociados con marcadores RAPD (Arnau *et al.*, 1994), (Micheli *et al.*, 1994) y (Penner *et al.*, 1993). Uno de los factores principales que afectan la reproducibilidad es la composición de la mezcla de reacción, que puede variar de un experimento a otro.

En la tabla 7 podemos encontrar el resultado de la secuenciación del producto de PCR; las secuencias fueron comparadas usando la herramienta BLAST en NCBI.

Tabla 7. Especies resultantes de la caracterización molecular por PCR.

AISLAMIENTO	ESPECIE
1C1	<i>P. radicum</i>
3B1	<i>P. expansum</i>
4C2	<i>P. radicum</i>
5_2	<i>P. expansum</i>
7	<i>P. expansum</i>
8D1	<i>P. radicum</i>
9A1	<i>P. expansum</i>
11A1	<i>P. expansum</i>
12E1	<i>P. expansum</i>
14A1	<i>P. expansum</i>
15A1	<i>P. expansum</i>
17A1	<i>P. expansum</i>
18A2	<i>P. expansum</i>
21B1	<i>P. radicum</i>
22B1	<i>P. radicum</i>
23A1	<i>P. expansum</i>

25A1	<i>P. radicum</i>
28A1	<i>P. radicum</i>
29C1	<i>P. radicum</i>
30A1	<i>P. radicum</i>
31B1	<i>P. radicum</i>
32B1	<i>P. expansum</i>
33A1	<i>P. radicum</i>
34B1	<i>P. expansum</i>
35B1	<i>P. chrysogenum</i>

Las 25 cepas que se utilizaron en este trabajo, se muestran en el dendrograma de la Figura 10 donde se aprecia que solo se encontraron 3 especies diferentes y no cuatro como se mostró en la caracterización morfológica además de que se presentó una especie, *P. radicum*, que se considera endófito (Hocking, *et al.*, 1998). La aparición de esta especie como patógena pudo ser debido a que es un parasito facultativo u oportunista (Agrios, 2002) ya que de la infección en campo se pudieron haber presentado ciertas condiciones para que se comportará como patógeno.

Dicho comportamiento de patógenos menores lo reporta también Van der Walt *et al.*, (2010) el cual indica en su trabajo que en alguna etapa del desarrollo de la pudrición en manzanas, pudo haber ocurrido la colonización sucesiva por especies saprofitas o facultativas y patógenos menores, tales como *P. ramulosum*; además, menciona el autor que también es posible que *P. ramulosum* puede predisponer manzanas a la infección por especies más virulentas. Otro trabajo que indica las acción de patógenos menores fue sugerido por Sanderson y Spotts (1995) que indican que *P. solitum*, predispone las heridas a la infección por *P. expansum*.

El 52% de los aislados analizados molecularmente dieron como resultado *P. expansum*, 44% *P. radicum* y solo el 4% *P. chrysogenum*. Cabe recalcar que no todas las pruebas moleculares coincidieron con las morfológicas, esto pudo ser debido a la gran variabilidad intra e interespecifica que presenta el género *Penicillium* (Pitt y Hocking, 1997), (Pitt, 1988). Además como lo menciona Pianzola, *et al.*, (2004) la identificación de estas especies con base a las características morfológicas en medios de cultivo es imprecisa pues hay variación entre los aislados de una misma especie. Por otra parte se corroboró que *P. expansum* es la especie

mayormente reportada y con mayor agresividad a nivel mundial (Barkai, 1974), (Borecka, 1977), (Combrink *et al.*, 1985), (Domsch *et al.*, 1980), (Jones *et al.*, 1990), (Sanderson *et al.*, 1995) y (Van der Walt *et al.*, 2010).

Por otra parte, se concordó con Domsch *et al.*, (1980), de que *P. chrysogenum* es también causante de pudrición en manzana.



Figura 10. Dendrograma obtenido de las secuencias de 25 cultivos monospóricos de *Penicillium* sp. de frutos de manzana del Estado de Chihuahua, comparadas con las especies *P. expansum*, *P. radicum* y *P. chrysogenum*.

CONCLUSIONES

El 52% de los aislados analizados molecularmente dieron como resultado *P. expansum*, 44% *P. radicum* y solo el 4% *P. chrysogenum*. Dicho porcentaje no concordó con las especies identificadas morfológicamente, inclusive hubo discrepancias entre especies: ya que en la caracterización morfológica se detectó a *P. chrysogenum* con 17.9%; *P. expansum* con 77.1% de los aislados; *P. solitum* con 2.5 % al igual que *P. verrucosum*. A pesar de su utilidad, la identificación fenotípica implica un conjunto de diferentes pruebas que requieren mucho tiempo y labor intensiva. Esto representa un gran inconveniente de este enfoque para la identificación. Además, todos los ensayos fenotípicos son dependientes de la expresión de genes, por lo tanto, es muy importante para normalizar los procedimientos para obtener resultados reproducibles. Hay una gran variabilidad dentro estas especies. Debido a la variabilidad inherente en el género, solo algunos aislados, incluso de fuentes comunes, son fácilmente identificables, muchas de las claves taxonómicas para identificar *Penicillium* sp. se basan principalmente en criterios morfológicos; la mayoría de ellos es a base de identificación micromorfología, macromorfología y colores producidos en el micelio o en el medio de crecimiento Sin embargo estos métodos no son muy confiables, ya que son criterios muy variables incluso dentro de la misma especie. Por ellos es importante recalcar la importancia de conjuntar la caracterización morfológica con la molecular para así concluir de manera más precisa a que especie no estamos refiriendo.

LITERATURA CITADA

- Agrios N.G.2002. Fitopatología. Ed. Limusa. México 838 pp.
- Arnau, J., Housego, A. P., y Oliver, R. P. 1994. The use of RAPD markers in the genetic analysis of the plant pathogenic fungus *Cladosporium fulvum*. *Current Opinion in Genetics*. 25:438-444.
- Barkai-Golan R. 1974. Species of *Penicillium* causing decay stored fruits and vegetables in Israel. *Mycopathol. Mycol. Appl.* 54: 141-145.
- Borecka, H. 1977. Fungi of the genus *Penicillium* on apples and pears during the storage period. *Acta agrobotanica*. 30: 213-227.
- Boysen, M. E., Jacobsson, K-G., y Schnürer, J. 2000. Molecular identification of species from the *Penicillium roqueforti* group associated with spoiled animal feed. *Applied Environmental Microbiology*. 66:1523-1526.
- Brause, A. R., Trucksess, M. W, Thomas, F. S., y Page, S. W. 1996. Determination of patulin in apple juice by liquid chromatography. Collaborative study. *Journal of AOAC International*. 79(2):452-455.
- Castle, A., Speranzini, D., Rghei, N., Alm, G., Rinker, D. y Bisset, J. 1998. Morphological and molecular identification of *Trichoderma* isolates on North American mushroom farms. *Applied Environmental Microbiology*. 64:133-137.
- Centre de Recherche Sur la Conservation des Collections. MYCOTA. Link de consulta: <http://mycota-crcc.mnhn.fr/site/accueil.php?lang=eng> fecha de conculata: 18 mayo de 2013.
- Chen, X., Romaine, Q., Tan, Q., Schlaghaufer, B., Ospina-Giraldo, M., Royse, D., y Huff, D. 1999. PCR-Based genotyping of epidemic and preepidemic *Trichoderma* isolates associated with green mold of *Agaricus bisporus*. *Applied Environmental Microbiology*. 65:2674-2678.
- Combrink, J. C., Kotze, J. M., Wehner, F. C., y Grobbelaar, C. J. 1985. Fungi associated with core rot of Starking apples in South Africa. *Phytophylactica* 17: 81-83.

- De Kock, S. L., Visagie, T. R., y Combrink, J. C. 1991. Control of core rot in Starkling apples. *Deciduous Fruit Grower*. 41:20-22.
- Domsch H.K. Gams W., y Anderson T. H. 1980. *Compendium of Soil Fungi* Academic Press, NY USA.
- Dupont J., Magnin, S., Marti, A., y Brousse, M. 1999. Molecular tools for identification of *Penicillium* starter cultures used in food industry. *International Journal of Food Microbiology*. 49:109-118.
- Frisvad J. C. 1981. Physiological criteria and mycotoxin production as aids in identification of common asymmetric penicillia. *Applied Environmental Microbiology*. 41:568-579.
- Frisvad J. C. y Filtenborg, O. 1983. Classification of terverticillate *Penicillia* based on profiles of mycotoxins and other secondary metabolites. *Applied Environmental Microbiology*. 46:1301-1310 .
- Giacinti, M. A. 2002. Horizonte estratégico mundial del negocio de la manzana y la tendencia de los precios en México. 2002. VIII Simposium Internacional sobre Manzana. 13-16 de Noviembre, Cd. Cuauhtémoc, Chihuahua, México. 24 p.
- Giacinti, M. A. 2003. Visión Mundial del consumo de la manzana en fresco. www.unifrut.com.mx. Consulta: diciembre 12, 2013.
- Heald F.D. y Ruehle G.D. 1931. The rots of Washington apples in cold storage. *Wash Agric. Exp. Stn. bull.* 253. 48pp.
- Hocking D. A., Whitelaw M. y Harden T. J. 1998. *Penicillium radicum* sp. nov. from the rhizosphere of Australian wheat. *Mycological Research*. 7 : 801-806 .
- Innis, M. A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. y White T.J. 1990. *PCR Protocols: A guide to Methods and applications*, academic Press, San Diego CA.
- Jones A. L. y Aldwinckle H. S. 1990. *Compendium of Apple and Pear Diseases*. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN.

- Jiménez, M., Mateo, R., Querol, A., Mateo, J., y Hernández, E. 1990. Differentiation of *Penicillium griseofulvum* Dierckx isolates by enzyme assays and by patulin and griseofulvin analyses. *Applied Environmental Microbiology*. 56:3718-3722.
- Jurick, W. M., Vico, I., McEvoy, J. L., Whitaker, B. D., Janisiewicz, W., y Conway, W. S. 2009. Isolation, purification, and characterization of a polygalacturonase produced in *Penicillium solitum*-decayed 'Golden Delicious' apple fruit. *Phytopathology* 99:636-641.
- Kirk P.M., Cannon P.F., Minter D.W. y Stalper J.A. 2008. *Dictionary of the Fungi*. CAB international. UK. 640 pp.
- Koffmann W. y Penrose, L. 1931. Fungicides for the control of blue mould (*Penicillium sp.*) in pome fruits. *Scientia Horticulturae*. 31: 225-232.
- Micheli, M. R., Bova, R., Pascale, E., y D'Ambrosio, E. 1994. Reproducible DNA fingerprinting with the random amplified polymorphic DNA (RAPD) method. *Nucleic Acids Research*. 22:1921-1922.
- McEvoy, J. L., Conway, W. S., y Janisiewicz, J. W. 2006. Virulence factors associated with *Penicillium expansum* and *P. solitum* during decay of apple fruit. (Abstr.) *Phytopathology* 96:S75.
- Paterson R. R. M., y Bridge, P. D. 1994. *Biochemical Techniques for Filamentous Fungi*, International Mycological Institute Technical Handbooks No. 1. CAB International, Wallingford, UK.
- Penner, G. A., Bush, A., Wise, R., Kim, W., Domier, I., Kashi, K., Laroche, A., Scoles, G., Molnar, S. J., y Fedak, G. 1993. Reproducibility of random amplified polymorphic DNA. *PCR Methods Applied*. 2:341-345.
- Pianzola M. J., Moscatelli M. y Vero S. 2004. Characterization of *Penicillium* Isolates Associated with Blue Mold on Apple in Uruguay. *Plant Disease* 88:23-28.
- Pitt, J. I. 1988. *A Laboratory Guide to Common Penicillium Species*, 2nd ed. CSIRO Division of Food Processing, North Ryde, New South Wales, Australia.

- Pitt, J. I., y Hocking, A. D. 2009. Fungi and Food Spoilage. Chapman & Hall, New York.
- Pitt, J. I., Spotts, R. A., Holmes, R. J., y Cruickshank, R. H. 1991. *Penicillium solitum* revived, and its role as a pathogen of pomaceous fruit. *Phytopathology* 81:1108-1112.
- Prusky, D. y Ben-Aire, R. 1985. Effect of imazalil on pathogenicity of *Penicillium sp.* Causing storage rots of pome fruits. *Plant Disease*. 69: 416-418.
- Ramírez L. M., Jacobo C. J., Ávila M. M., y Parra Q. A.. 2006. Pérdidas de cosecha, eficiencia de producción y rentabilidad de huertos de manzano con diversos grados de tecnificación en Chihuahua, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 29:215-222.
- Ramirez, C. 1983. Manual and Atlas of the Penicillia. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.
- Ramírez-Legarreta y Jacobo-Cuéllar, J.L. 2002. Manejo de la pudrición de cuello en manzano. pp. 50-57. En: A. García (ed.). *Memorias del VIII Simposium Internacional sobre Manzano y Frutales de Clima Templado*. Asociación de Manzaneros de Cuauhtémoc. A.C. Cuauhtémoc, Chihuahua, México. 130 p.
- Ramírez-Legarreta, M.R., Jacobo-Cuéllar, J.L., Avila-Marioni, M.R., y Gutiérrez-González, R. 1999. Manejo del tizón de fuego en manzano en el Noroeste de Chihuahua. *Memorias del XXVII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología*. Puerto Vallarta, Jalisco, México. Resumen L-9.
- Ramírez-Legarreta, M.R., y Jacobo-Cuellar, J.L. 1999. Estructura de un modelo para el roseteado de la manzana Golden Delicious considerando algunos de los factores que influyen en su desarrollo. *Revista Mexicana de Fitopatología* 17:1-7.
- Ramírez-Legarreta, M.R., y Jacobo-Cuéllar, J.L. 1999. Estructura de un modelo para el corazón mohoso (*Alternaria alternata* f. sp. *mali*) de la manzana Red Delicious. *Revista Mexicana de Fitopatología* 17:29-36.
- Raper, K. B., y Thom, C. 1949. A Manual of the Penicillia. William and Wilkins Co., Baltimore.
- Sanderson, P. G., y Spotts, R. A. 1995. Postharvest decay of winter pear and apple fruit caused by species of *Penicillium*. *Phytopathology* 85:103-110.

- Serdani, M., Crous, P. W., Holz, G., y Petrini, O. 1998. Endophytic fungi associated with core rot of apples in South Africa, with specific reference to *Alternaria* species. *Sydowia* 50:257-271.
- Spotts, R. A., Holms, R. J., y Washington, W. S. 1988. Factors affecting wet core rot of apples. *Australasian Plant Pathology*. 17:53-57.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, y Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
- Van der Walt, L., Spotts, R. A., Visagie, C. M., Jacobs, K., Smit, F. J., y McLeod, A. 2010. *Penicillium* species associated with preharvest wet core rot in South Africa and their pathogenicity on apple. *Plant Disease*. 94:666-675.
- Webster J. 1986. *Introduction to Fungi*. 2° ed. Cambridge University Press.

CAPÍTULO II AGRESIVIDAD DE *Penicillium* sp. EN FRUTOS DE MANZANA VAR. GOLDEN DELICIOUS

Omar Hernández Romero, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2014

Los patógenos postcosecha causan pérdidas importantes en la producción de manzana. Más de 90 especies de hongos se han descrito como agentes causantes de pudriciones durante el almacenamiento. El moho azul es la enfermedad postcosecha más importante en todo el mundo, la cual consiste en una pudrición blanda causada por varias especies de *Penicillium* sp., incluyendo *Penicillium expansum*, que es el más agresivo y el más comúnmente reportado. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar la agresividad de 25 aislamientos del estado de Chihuahua durante el año 2013. Frutos de manzana var. Golden Delicious fueron inoculados a los 2, 4, 6, 8 y 10 días después de la inoculación se evaluó la severidad de la enfermedad. Diferencias en agresividad de los aislamientos fue significativa ($P=0.05$). Solo 12 de los 25 aislados de *Penicillium* sp. presentaron la sintomatología clásica de la enfermedad: pudrición blanda, acuosa, de color pardo claro y en la superficie aparece primero un moho blanco que luego se torna verde-azulado y produjo coremios en la superficie de algunos frutos. Los 13 aislados que no produjeron síntomas se deba a que pertenece a la especie endófito, *P. radicum*, la cual se presenta como un parasito facultativo u oportunista. En este estudio, *P. expansum* resultó agresiva en los frutos de la variedad Golden Delicious.

Palabras clave: Moho azul, patogenocidad, postcosecha

AGGRESSIVENESS OF *Penicillium* sp. ON APPLE FRUITS VAR. GOLDEN DELICIOUS

Omar Hernández Romero, M.Sc.

Colegio de Postgraduados, 2014

The post-harvest pathogens cause important losses on apple production. Most of 90 mold species has been described as, agents cause of rots during storage. Blue mold is the post-harvest disease most important worldwide. This disease is a soft rot caused by several species of *Penicillium* sp., including *Penicillium expansum*, and it is the most aggressive and the most commonly reported. The objective of this study was to characterize the aggressive of 25 isolations from Chihuahua State on 2013. Apple fruits var. Golden Delicious were inoculated to 2, 4, 6, 8, and 10 days afterwards inoculation, and disease severity was assessed. Differences in aggressiveness of isolations were significant ($P=0.05$). Only 12 of 25 isolations of *Penicillium* sp., showed classical symptoms of the disease: soft rot, watery, fawn color; on surface, first appears a white mold, then turn into blue-green color, and produced coremium on surfaces of some fruits. The 13 isolates that no produced symptoms due to belonging to the endophyte species; *P. radicum*. Which is showed as a optional or opportunistic parasite. In this study, *P. expansum* was aggressive on the Apple fruits var. Golden Delicious.

Key words: blue mold, pathogenicity, post-harvest.

INTRODUCCIÓN

La necesidad de aumentar la investigación sobre el control de enfermedades de postcosecha se basa en el hecho de que será difícil aumentar los suministros mundiales de alimentos. Se debe poner mayor énfasis a los estudios de la patología en postcosecha, ya que la sola una pequeña parte de los estudios de fitopatología, hacen referencia a las enfermedades de los frutos en postcosecha (Kelman, 1989).

Las pérdidas postcosecha son un tema que no se le debe restar atención ya que tan solo en los Estados Unidos, las pérdidas de frutas y hortalizas frescas se estima que oscila entre 2% y el 23%, dependiendo del producto, con un promedio general de 12% a pesar de la tecnología con la que se cuenta actualmente (Cappellini y Ceponis, 1984); (Harvey, 1978) y (Kantor *et al.*, 1997).

Las pérdidas causadas por las enfermedades de postcosecha son mayores a lo que generalmente se cree, porque el valor de las frutas y verduras aumenta varias veces al pasar desde el campo hasta el consumidor final (Eckert y Sommer, 1967). Bajo condiciones favorables para los patógenos, la pérdida causada por las enfermedades postcosecha puede ser mayor que los beneficios económicos obtenidos por las mejoras en la producción primaria. La pérdidas económicas sufridas por enfermedades de almacenamiento puede ser superior a la causada por enfermedades de campo debido a las grandes inversiones en los tratamientos globales y procesos del producto experimenta desde la cosecha hasta que llega al cliente, que incluyen la recolección, clasificación, empaque, envío y almacenamiento (Barkai, 2001).

La reducción de las pérdidas en los cultivos debido a las enfermedades postcosecha se ha convertido en uno de los principales objetivos de las organizaciones internacionales. La realidad es que hay una crisis alimentaria que augura que serán necesarios los esfuerzos concertados de todos los que están involucrados en la producción de alimentos a redoblar sus esfuerzos. De hecho, para alimentar a las 10 mil millones de personas esperadas dentro de los próximos 40 a 50 años, la eficacia de producción de alimentos y la distribución tendrán que ser mejoradas enormemente (Campbell, 1998).

En el estado de Chihuahua, México, los costos del manejo de plagas en manzano *Malus sylvestris* (L.) Mill. varían de 10.6 hasta el 22.2% de los costos totales de producción. A pesar de los recursos empleados para manejar dichos problemas, la permanencia de éstos es constante con

oscilaciones periódicas que ponen en peligro la costeabilidad global de la cosecha, ocasionando pérdidas directas en cantidad y calidad (Ramírez *et al.*, 2004).

La producción de manzana en 2012 tuvo una producción de 375,044.9 ton de una superficie cosechada de 58,451.25 ha y un promedio en el rendimiento de 6.42 ton.ha⁻¹; logrando con ello un valor de la producción que asciende a \$3,008,862,990.00. El estado de Chihuahua tiene la mayor área cosechada para este año con 25,123 ha, seguido de Durango y Puebla con una superficie de 10,602.75 y 8,280.16 ha respectivamente. En relación a la producción, el mismo estado de Chihuahua mantiene su hegemonía con 207,139.17 ton seguido de Durango (61,136.64 ton) y Coahuila (36,751.9 ton). Los rendimientos más altos pertenecieron a Morelos con 17.76 ton.ha⁻¹ y Veracruz con 11.02 ton.ha⁻¹ (SIAP, 2014).

Los patógenos postcosecha causan pérdidas importantes en la producción de manzana. Más de 90 especies de hongos se han descrito como agentes causantes de pudrición de manzana durante el almacenamiento (Jones *et al.*, 1990). El moho azul causado por *Penicillium* sp. es la enfermedad postcosecha más importante de manzana en todo el mundo (Pianzola *et al.*, 2004). El moho azul es una pudrición blanda causada por varias especies de *Penicillium* sp. incluyendo *Penicillium expansum*, que es el más agresivo y el más comúnmente reportado. *P. expansum* presenta conidióforos terverticilados lisos, compuestos por filíde (9,7±0,9 µm de largo), métula (11,2±1,1 µm de largo), rama y pie (4,1±0,5 µm de ancho), presenta abundante producción de conidias en cadenas sin ramificar, elipsoides, lisas, en promedio de 2,8±0,1 x 3,3±0,1 µm y desarrolla coremio en uva de mesa a 0°C después de 15 días aproximadamente (Rosenberger, 1990) y (Jones *et al.*, 1990).

Durante el almacenamiento de frutos de manzana ocurren pérdidas debidas principalmente a daños producidos por hongos, de los cuales más de 80% son atribuidas a la pudrición azul ocasionada por este hongo que es capaz de desarrollarse por debajo de 0°C (Spotts *et al.*, 1999).

Los frutos atacados manifiestan un olor a humedad y las zonas de lesión consisten de masas blandas. Las esporas pueden llegar a sobrevivir durante largas temporadas en contenedores de madera, paredes, techos de frigoríficos, donde el hongo puede crecer y reproducirse (Snowdon, 1990).

En el huerto, *Penicillium expansum* sobrevive en restos orgánicos en el suelo del huerto, y tal vez en la corteza de árboles muertos. Los conidios se encuentran también presentes en el aire y en la superficie de la fruta. En las instalaciones de empaque, en los canales de agua y el agua de descarga del tanque para tratamientos a la fruta, son fuentes comunes de esporas de *Penicillium*. Las esporas de *P. expansum* son también comúnmente presentes en el aire y en las paredes de las salas de almacenamiento (Rosenberger, 1990).

P. expansum es esencialmente un patógeno que entra por heridas. Las heridas en la piel del fruto, tales como pinchazos y golpes que se crean durante la cosecha o durante el proceso de postcosecha son la entrada principal de la invasión del hongo. La fruta también puede ser inoculada con *Penicillium* durante el proceso de embalaje. *P. expansum* también puede causar pudriciones a través de la infección en las lenticelas, pero este tipo de infección ocurre generalmente en exceso de fruta madura o cuando las lenticelas han sido heridas. (Sugar *et al.*, 1999).

La limpieza del huerto para eliminar fruta podrida y basura orgánica en el suelo del huerto ayuda a reducir los niveles de inóculo de *Penicillium*. Una buena cosecha y la gestión de manejo para minimizar los golpes y magulladuras en la fruta ayudan a prevenir que el fruto se contamine por *P. expansum* y otras especies de *Penicillium*. (Rosenberger, 1990). En la actualidad el control químico con fungicidas sintéticos es el más utilizado contra estos hongos. Aunque este tipo de control es eficiente, también presenta algunas desventajas: selección de cepas resistentes (Kim y Xiao, 2010), riesgo para la salud humana y el ambiente. La residualidad de los fungicidas sintéticos puede contaminar agua, suelo y aire, así como alimentos en los que se aplican. Debido a los riesgos toxicológicos involucrados, varios fungicidas han sido retirados del mercado (Calvo *et al.*, 2007). Las tácticas alternativas de control de estas enfermedades son necesarias debido a los altos costos económicos para el desarrollo de nuevos grupos de agroquímicos (Yu *et al.*, 2007).

MATERIALES Y MÉTODOS

Origen de la Muestra

Durante el año 2013 se colectaron de la central de abastos de la Ciudad de México, frutos de manzana var Golden Delicious provenientes del municipio de Cuauhtémoc, Chihuahua (Figura 1). Se eligieron 38 puntos de venta de los cuales se obtuvieron 5 submuestras de cada uno. De estas muestras y submuestras se eligieron los frutos que presentaron signos y síntomas característicos del patógeno en estudio, de los cuales se obtuvieron cultivos puros a partir de la técnica de punta de hifa.



Figura 1. Localización del origen de la fruta muestreada.

Aislamiento del Patógeno

De los frutos colectados que presentaron la pudrición característica de *Penicillium expansum* se procedió a colocarlos en cámara húmeda por un periodo de 7 días hasta que algunos frutos mostrarán la esporulación exclusiva del género.

Se sembró la esporulación en cajas petri de 90 x 15 mm con medio Papa-Dextrosa-Agar Bioxon (PDA, 39 g L⁻¹ en 1000 ml); se dejó a 23°C ± 1°C por 5 días. Se transfirió fragmentos de micelio

de 5mm de diametro obtenidos con un sacabocados a medio de cultivo con agar bacteriológico Bioxon (2g L⁻¹ en 1000 ml) por 8 días a 23°C ± 1°C. De las colonias formadas se transfirió por medio de la técnica de punta de hifa a medio PDA; esto para asegurar homogeneidad en las colonias puras.

Conidios y micelio de colonias puras con 8 días de crecimiento se conservaron en ultracongelación (ultracongelador Thermo Scientific model 700 Series) a -80°C en una solución de 1 ml de glicerol al 20% en tubos eppendorf. Se conservaron 25 aislamientos que se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Aislamientos utilizados para las pruebas de agresividad de *Penicillium* sp.

Número	Aislamiento	Especie	Fecha de Aislamiento
1	1C1	<i>P. radicum</i>	12/01/2013
2	3B1	<i>P. expansum</i>	12/01/2013
3	4C2	<i>P. radicum</i>	12/01/2013
4	5_2	<i>P. expansum</i>	12/01/2013
5	7	<i>P. expansum</i>	12/01/2013
6	8D1	<i>P. radicum</i>	12/01/2013
7	9A1	<i>P. expansum</i>	12/01/2013
8	11A1	<i>P. expansum</i>	26/01/2013
9	12E1	<i>P. expansum</i>	26/01/2013
10	14A1	<i>P. expansum</i>	26/01/2013
11	15A1	<i>P. expansum</i>	26/01/2013
12	17A1	<i>P. expansum</i>	26/01/2013
13	18A2	<i>P. expansum</i>	26/01/2013
14	21B1	<i>P. radicum</i>	09/02/2013
15	22B1	<i>P. radicum</i>	09/02/2013
16	23A1	<i>P. expansum</i>	09/02/2013
17	25A1	<i>P. radicum</i>	09/02/2013
18	28A1	<i>P. radicum</i>	09/02/2013

19	29C1	<i>P. radicum</i>	09/02/2013
20	30A1	<i>P. radicum</i>	09/02/2013
21	31B1	<i>P. radicum</i>	09/02/2013
22	32B1	<i>P. expansum</i>	02/03/2013
23	33A1	<i>P. radicum</i>	02/03/2013
24	34B1	<i>P. expansum</i>	02/03/2013
25	35B1	<i>P. chrysogenum</i>	02/03/2013

Pruebas de Agresividad en Manzana

Manzanas maduras (var. Golden Delicious) susceptibles al ataque de *Penicillium expansum* se desinfectaron en una solución al 1% de hipoclorito de sodio, luego se enjuagaron dos veces con agua estéril. Cada fruta fue pinchada con un mondadientes esterilizado (3 mm de espesor y 5 mm de profundidad) en el ecuador del fruto. Con una cámara de Neubauer se contabilizaron suspensiones de conidios (10^6 conidios ml^{-1}); cada herida se inoculó con 20 μL de esta suspensión a partir de cultivos de *Penicillium* con 7 días de edad. Los frutos testigos recibieron 20 μL de agua estéril; se realizaron 8 repeticiones por cada aislamiento incluyendo testigo con herida y sin herida (Figura 2).

Los frutos inoculados se colocaron en cámara húmeda a $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ a 100% de humedad relativa, con fotoperiodo total. El diámetro de las lesiones (ancho y largo) se midió a los 2, 6, 8 y 10 días después de la inoculación (DDI). Los diámetros de las lesiones se compararon por análisis de varianza utilizando el procedimiento GLM de SAS (versión X SAS / STAT, 1996, SAS Institute, Cary, NC). Las fuentes de variación en el experimento de la tasa de crecimiento de la lesión fueron las especies y cepas. De los frutos con esporulación se reaislaron para corroborar los postulados de Koch.

Análisis Estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar. La agresividad de los aislamientos de *Penicillium* sp. sobre los frutos de manzana, variedad Golden Delicious fue evaluado comparando

los diámetros de crecimiento. Como no se presentó homogeneidad de la varianza de los resultados, el análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza no paramétrico de Kruskal Wallis y cuando los tratamientos no presentaron el mismo efecto en agresividad se realizó una prueba de comparación de medias usando el método de Bonferroni ($\alpha = 0.05$) a través del programa SAS (versión X SAS / STAT, 1996, SAS Institute, Cary, NC).

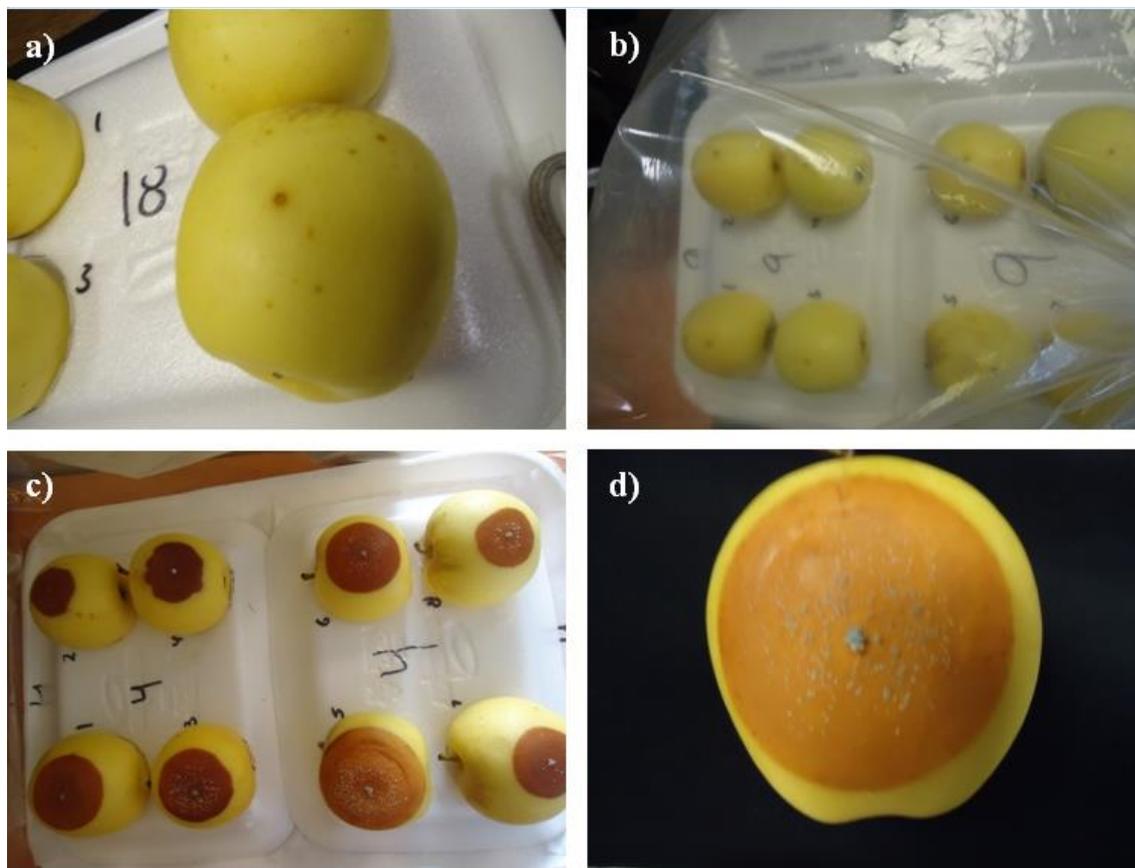


Figura 2. Pruebas de agresividad en frutos de manzana; a) pinchado con mondadientes, b) cámara húmeda con 8 repeticiones, c) y d) esporulación del hongo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Solo 12 cultivos puros presentaron la sintomatología característica de *Penicillium expansum* los cuales consistieron en el desarrollo de una pudrición blanda, acuosa, de color pardo claro, en la superficie aparece primero un moho blanco que luego se torna verde-azulado y produjo coremios en la superficie de algunos frutos (Figura 3); dicha sintomatología concuerda con la descrita por Pianzola *et al.*, (2004) y Van der Walt *et al.*, (2010).

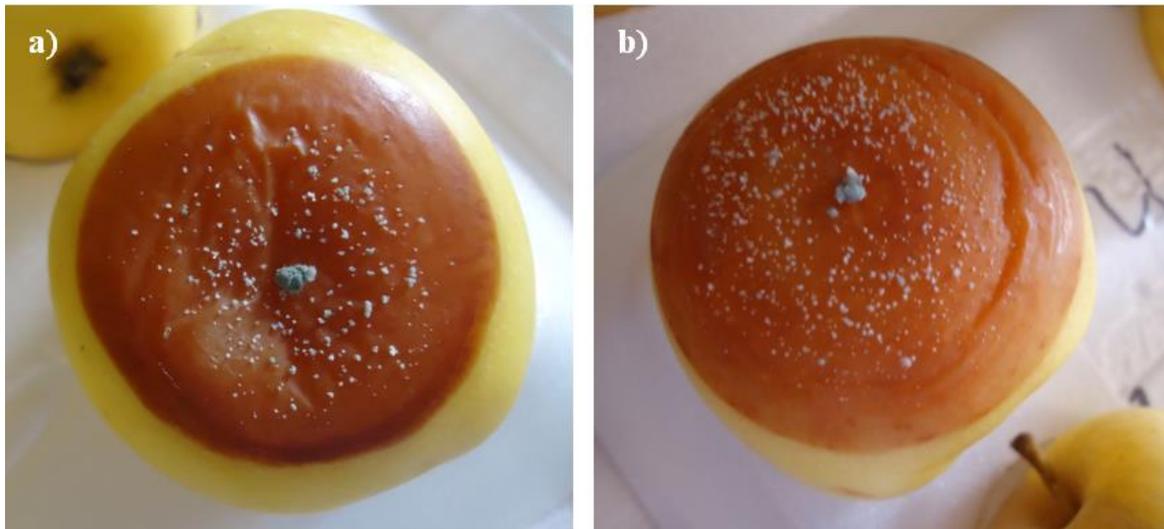


Figura 3. Síntomas y signos de pudrición por *Penicillium expansum* a) pudrición moderada con esporulación y b) pudrición que llena casi en su totalidad al fruto con esporulación.

A los 10 DDI, del total de los frutos inoculados (sin contar los testigos) el 52% no presentó ni pudrición ni mucho menos esporulación; 42% presentaron, además de pudrición, esporulación característica del hongo y solo el 6% presentaron únicamente pudrición. En la Figura 4 se muestra el aumento en el diámetro de la lesión de aquellos aislamientos que si presentaron la sintomatología de la enfermedad.

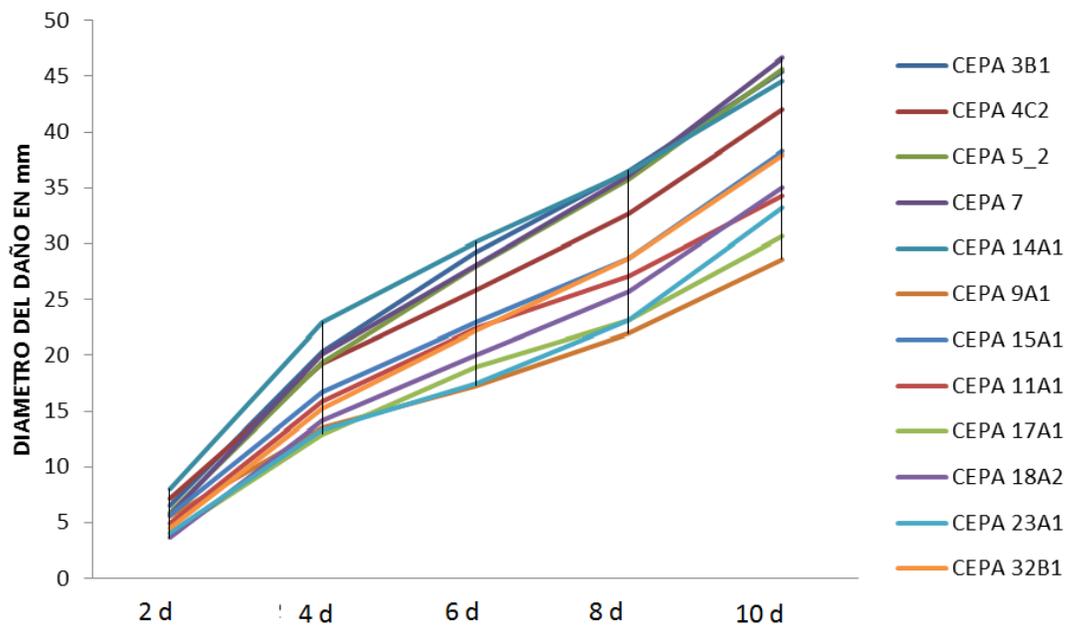


Figura 4. Crecimiento de las lesiones de aislamientos de *Penicillium expansum* de 2 hasta 10 DDI.

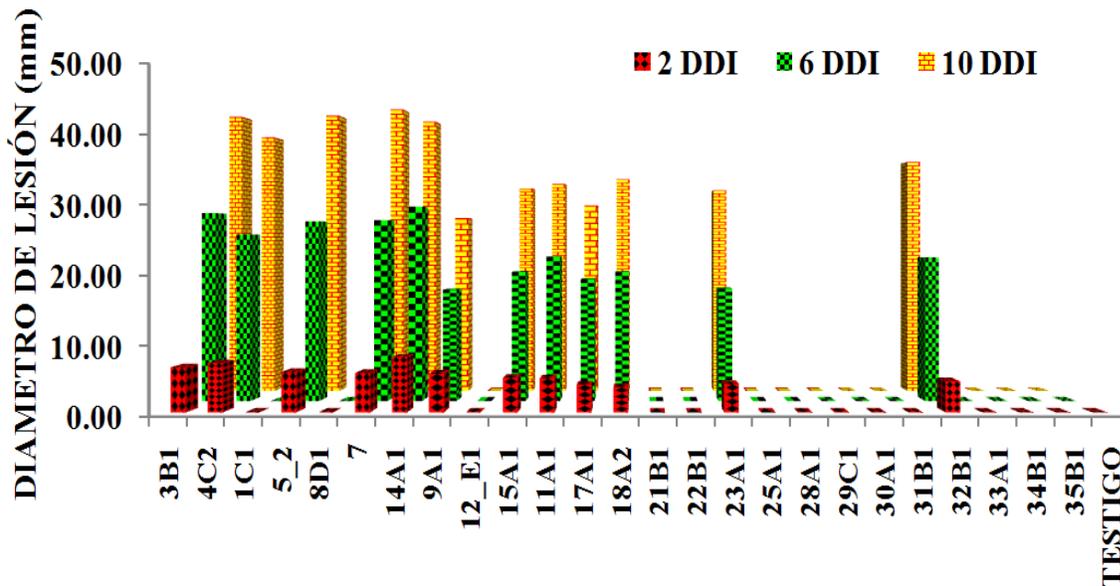


Figura 5. Agresividad de los cultivos de *Penicillium expansum* inoculados sobre frutos de manzana variedad Golden delicius a los 2, 6 y 10 días después de la inoculación (DDI).

La agresividad de los 25 cultivo de *Penicillium* sp. inoculados sobre frutos de manzana var Golden Delicious fue muy variable como se muestra en la figura 5 y en la Tabla 2. Los aislados más agresivos a los 2 DDI fue el 14A1 y el 4C2 con 8.1 y 7.2 mm respectivamente de diámetro; para los 4 DDI el aislado 14A1 se mantuvo en la cabeza con 23 mm de diámetro; lo mismo sucedió a los 6 DDI. A los 8 DDI los aislados 3B1, 14A1, 7 y 5_2 fueron los que presentaron el mayor diámetro de lesión; pero finalmente a los 10 DDI, el aislado con mayor diámetro de la lesión fue el 7 con 46.64 mm.

Tabla 2. Agresividad de aislamientos de *Penicillium expansum*, observada a diferentes días, sobre frutos de manzana, variedad Golden Delicious.

AISLA. ^β	DIÁMETRO DE LESIÓN (mm)									
	2 DDI		4 DDI		6 DDI		8 DDI		10 DDI	
3B1	6.59	ABC†	20.35	AB	29.17	AB	36.55	A	45.4	AB
4C2	7.19	A	19.23	ABCD	25.85	ABCD	32.68	AB	41.98	ABC
1C1	0	E	0	E	0	E	0	C	0	E
5_2	5.9	ABCD	19.38	ABCD	27.91	ABC	35.79	A	45.6	AB
8D1	0	E	0	E	0	E	0	C	0	E
7	5.74	ABCD	20.11	ABC	28.1	ABC	36.12	A	46.64	A
14A1	8.05	A	23	A	30.18	A	36.41	A	44.61	AB
9A1	5.64	BCD	13.5	CD	17.27	D	21.6	B	28.63	D
12_E1	0	E	0	E	0	E	0	C	0	E
15A1	5.03	BCD	14.59	BCD	20.06	BCD	25.14	AB	33.53	ABCD
11A1	4.94	BCD	15.91	BCD	22.39	ABCD	27.09	AB	34.28	ABCD
17A1	4.03	D	12.94	D	18.92	CD	23.17	B	30.75	CD
18A2	3.66	D	14.16	BCD	20.05	BCD	25.69	AB	35.06	ABCD
21B1	0	E	0	E	0	E	0	C	0	E
22B1	0	E	0	E	0	E	0	C	0	E
23A1	4.09	D	13.34	D	17.47	D	23.14	B	33.23	BCD
25A1	0	E	0	E	0	E	0	C	0	E
28A1	0	E	0	E	0	E	0	C	0	E
29C1	0	E	0	E	0	E	0	C	0	E

30A1	0	E	0	E	0	E	0	C	0	E
31B1	0	E	0	E	0	E	0	C	0	E
32B1	4.53	CD	15.24	BCD	22.27	ABCD	28.73	AB	37.92	ABCD
33A1	0	E	0	E	0	E	0	C	0	E
34B1	0	E	0	E	0	E	0	C	0	E
35B1	0	E	0	E	0	E	0	C	0	E
TESTIGO	0	E	0	E	0	E	0	C	0	E
x^2	189.43		189.23		189.11		188.76		188	
DF	25		25		25		25		25	
Pr > x^2	<.0001		<.0001		<.0001		<.0001		<.0001	

† Tratamientos con la misma letra en cada columna no son significativamente diferentes

^β Aislamiento

Los aislamientos que, además del testigo, presentaron nulo crecimiento a 10 DDI, pertenecen a la especie *P. radicum*, que se considera una especie endófito (Hocking *et al.*, 1998). Esto pudo ser debido a que es un parasito facultativo u oportunista (Agrios, 2002) y que en la infección en campo se pudieron haber presentado ciertas condiciones para que se comportará como parasito y al realizar las pruebas de agresividad, no presentó ninguna lesión a los frutos debido a que ya no se presentaron dichas condiciones que lo hicieron comportarse como parasito en la infección en campo.

Por otra parte, los demás resultados muestran que los cultivos de los aislados de *Penicillium sp.* obtenidos de frutos de manzana, difieren en su capacidad para dañar frutos de manzana de la variedad Golden Delicious en postcosecha con base al tamaño de las lesiones provocadas sobre los frutos.

Considerando el diámetro de lesión producido por los 25 aislamientos de *Penicillium sp.* a los 10 días, fue posible agruparlos en nula agresión, medianamente agresivos y altamente agresivos. Esto se realizó transformando a porcentaje el diámetro de las lesiones causadas por los aislamientos en cada fecha de evaluación. El aislado que mostró el máximo valor de diámetro de lesión en la evaluación fue el 7 y se asignó el 100%; al resto de los aislados les correspondió un porcentaje con base al valor del aislado con mayor diámetro, tal como se muestra en la figura 6.

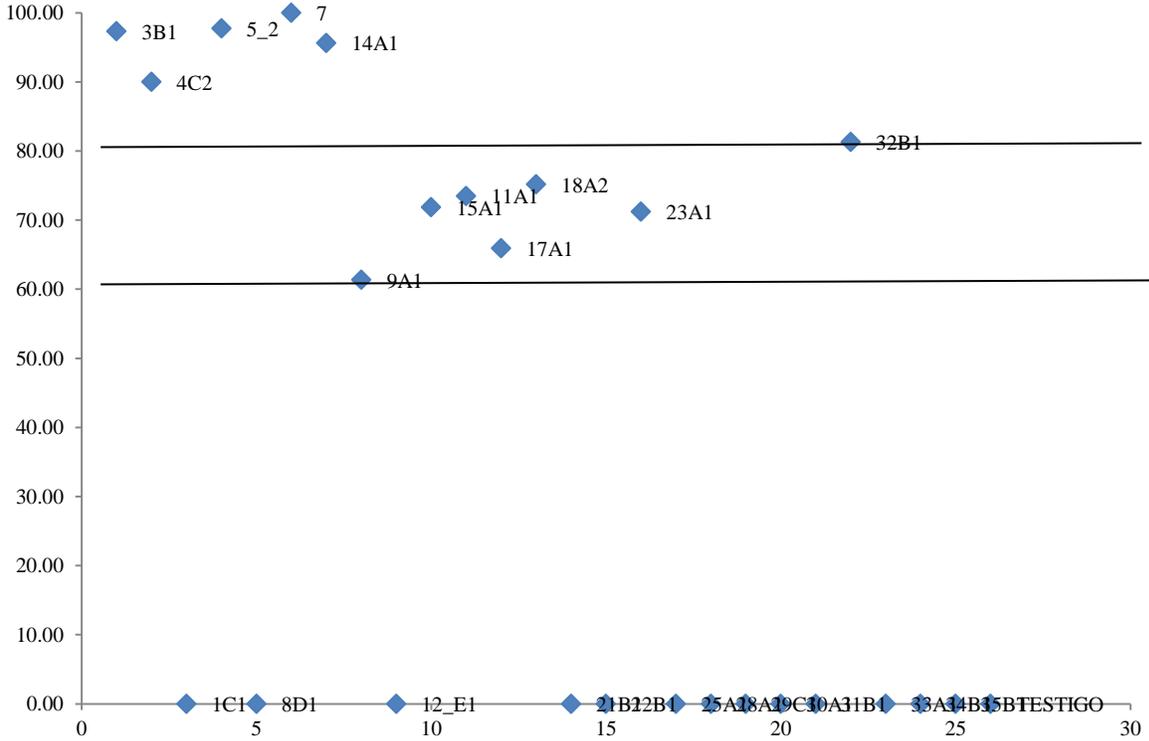


Figura 6. Grado de agresividad de 25 aislamientos de *Penicillium expansum* obtenidos de frutos de manzana provenientes del estado de Chihuahua a los 10 días después de la inoculación en frutos variedad Golden Delicious.

De esta manera, los aislados que mostraron diámetros de lesión igual o mayor del 81.3% fueron considerados altamente agresivos, entre 61.4 y 75.2% se consideraron moderadamente agresivos y los que presentaron 0%, se consideraron nulamente agresivos.

El 24% de los aislados presentaron un diámetro mayor de lesión, considerándolos como altamente agresivos, del cual destaca el aislado 7; otro 24% de los aislados presentó un diámetro de lesión considerados como moderadamente agresivos; finalmente el 52% de los aislados se presentó como agresividad nula, los cuales pertenecen a la especie *P. radicum*, esto coincide con Van der Walt *et al.*, (2010); este último menciona en su investigación con *P. ramulosum*, que es posible que este patógeno menor predispone a las manzanas a la infección por especies más

virulentas. Así Sanderson y Spotts (1995) mencionan que *P. solitum*, predispone las heridas a la infección por *P. expansum*.

Robles (2010), estimó en su trabajo en duraznos con *Monillinia fruticola* parámetros para medir agresividad de 81.2% o más para cultivos altamente agresivos, 41.76 y 76.24% para moderadamente agresivos y menores de estos datos a cultivos menos agresivos.

De los aislados altamente y moderadamente agresivos, se graficó el área bajo la curva del progreso de la enfermedad lo cual se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Crecimiento acumulado de 12 aislados de *Penicillium expansum* inoculados en frutos de manzana var. Golden Delicious en 4 periodos de incubación del día 2 al día 10 después de la inoculación, evaluada con base en el área bajo la curva del progreso de la enfermedad de los diámetros de la lesión.

AISL.	D2-D4	D2-D6	D2-D8	D2-D10
3B1	13.76	22.58	29.96	38.81
4C2	12.04	18.66	25.49	34.79
5_2	13.48	22.01	29.89	39.7
7	14.37	22.36	30.38	40.9
14A1	14.95	22.13	28.36	36.56
9A1	7.86	11.63	15.96	22.99
15A1	9.56	15.03	20.11	28.5
11A1	10.97	17.45	22.15	29.34
17A1	8.91	14.89	19.14	26.72
18A2	10.5	16.39	22.03	31.4
23A1	9.25	13.38	19.05	29.14
22B1	10.71	17.74	24.2	33.39

Los aislados con agresividad alta y moderada son de la especie *Penicillium expansum* lo que concuerda con Pianzola *et al.*, (2004) que concluyó en sus resultados de pruebas de agresividad

a 5 °C que tanto *P. solitum* y *P. expansum* produce diámetros de las lesiones significativamente diferentes en manzanas; este autor menciona además que *P. expansum* es la especie más agresiva y es el más frecuentemente relacionado con las pérdidas de moho azul durante almacenamiento de manzanas en Uruguay. Por su parte Van der Walt *et al.*, (2010) dicta en su investigación que los promedios en tamaño de la lesión de sus experimentos con *P. expansum* variaron, como en el presente estudio, desde 54 hasta 65 mm; el autor, además, utilizó un método de inoculación sin herida y demostró que algunas cepas y especies eran capaces de causar enfermedad sin heridas artificiales, lo que sugiere que estas cepas son más virulentas y que este método se puede utilizar para diferenciar la virulencia de las cepas. El autor concluye que las especies de *Penicillium* sp. varían en la patogenicidad y virulencia y, al igual que el presente trabajo, que *P. expansum* es la especie más virulenta.

CONCLUSIONES

P. expansum resultó altamente patogénico a la variedad Golden Delicious con porcentajes de agresividad de más de 81%, en periodos de incubación de 10 días. Además hubo diferencias en agresividad o patogenicidad entre aislamientos de *P. expansum* ya que hubo aislamiento con una agresividad de más de 81.3% que fueron considerados altamente agresivos y hubo además aislamientos con una agresividad de entre 61.4 y 75.2% se consideraron moderadamente agresivos. Solo 12 de los 25 aislados de *Penicillium* sp. presentaron la sintomatología clásica de la enfermedad, una pudrición blanda, acuosa, de color pardo claro, en la superficie aparece primero un moho blanco que luego se torna verde-azulado y produjo coremios en la superficie de algunos frutos; los 13 aislados que no presentaron sintomatología es que porque son de una especie endófito, *P. radicum* que se presenta como un parasito facultativo u oportunista; siendo *P. expansum* la especie más agresiva en México.

LITERATURA CITADA

- Agrios N.G.2002. Fitopatología. Ed. Limusa. México 838 pp.
- Barkai G. R. 2001. Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables Development and Control Elsevier B.V. Holanda 418 pp.
- Calvo J, Calvente V, de Orellano M, Benuzzi D y Sanz de Tosetti M. 2007. Biological control of postharvest spoilage caused by *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* in apple by using the bacterium *Rahnella aquatilis*. International Journal of Food Microbiology 113:251-257.
- Campbell, C.L. 1998. Food security and plant pathologists. Phytopathology News 32:70.
- Cappellini, R.A. y Ceponis, M.J. 1984. Postharvest losses in fresh fruits and vegetables. p. 24-30. En: H.E. Moline (ed.), Postharvest pathology of fruits and vegetables: postharvest losses in perishable crops. Univ. Calif. Bull. 1914.
- Eckert, J.W. y Sommer N.F 1967. Control of diseases of fruits and vegetables by postharvest treatment. Annual Review Plant Pathology. 5:391-432.
- Harvey, J.M. 1978. Reduction of losses in fresh market fruits and vegetables. Annual Review Phytopathology. 16:321-341.
- Hocking D. A., Whitelaw M. y Harden T. J. 1998. *Penicillium radicum* sp. nov. from the rhizosphere of Australian wheat. Mycological Research. 7 : 801-806.
- Jeffries, P. y Jeger. M.J. 1990. The biological control of postharvest diseases of fruit. Biocontrol News and Information. 11:333-336.
- Jones, A. L., y Aldwinckle, H. S. 1990. Compendium of Apple and Pear Diseases. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN.

- Kantor, L.S., Lipton, K., Manchester, A., y Oliveira, V. 1997. Estimating and addressing America's food losses. *Food Review* 20:3-11.
- Kelman, A. 1989. Introduction: The importance of research on the control of postharvest disease of perishable food crops. *Phytopathology* 1374 (nota).
- Pianzola M. J., Moscatelli M. y Vero S. 2004 Characterization of *Penicillium* Isolates Associated with Blue Mold on Apple in Uruguay. *Plant Disease* 88:23-28.
- Ramírez-Legarreta, M.R., Jacobo-Cuéllar, J.L., Ávila-Marioni, M.R., y Gutiérrez-González, R. 2004. Validación de un sistema de manejo integrado de plagas y enfermedades en huertos de manzano [*Malus sylvestris* (L.) Mill. var. *domestica* (Borkh.) Mansf.] en Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22:277-289.
- Robles Y.L. 2010. Caracterización morfológica y molecular de aislamientos de *Monillinia* frutícola obtenidos de frutos de duraznos [*Prunus pérsica* (L.) Batsch] en México y pruebas de agresividad en duraznos, pera y manzana. Colegio de Postgraduados. Tesis de Maestría en Ciencias.
- Rosenberger, D. A. 1990. Blue mold. Pages 54-55 En: *Compendium of Apple and Pear Diseases*. A. L. Jones and H. S. Aldwinckle (ed.). American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2013. Linck de consulta: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/>. Fecha de consulta: 5 de enero de 2014.
- Snowdon, A.L. 1990. *Color Atlas of Post-Harvest Diseases and Disorders of Fruits and Vegetables*, Vol. 1, General Introduction and Fruits. CRC Press, Boca Raton FL.
- Spotts R. A. I.A. Cervantes E. A. Mielke. 1999. Variability in postharvest decay among apple cultivars. *Plant Disease*. 83:1051-1054.

- Sugar, D., y Spotts, R. A. 1999. Control of postharvest decay in pear by four laboratory-grown yeasts and two registered biocontrol products. *Plant Disease*. 83:155-158.
- Van der Walt, L., Spotts, R. A., Visagie, C. M., Jacobs, K., Smit, F. J., y McLeod, A. 2010. *Penicillium* species associated with preharvest wet core rot in South Africa and their pathogenicity on apple. *Plant Disease*. 94:666-675.
- Xiao, C. L., Kim, Y. K., y Boal, R. J. 2011. First report of occurrence of pyrimethanil resistance in *Penicillium expansum* from stored apples in Washington State. *Plant Disease* 95:72 (Note).
- Yu T, Chen J, Chen R, Huang B, Liu D y Zheng X. 2007. Biocontrol of blue and gray mold diseases of pear fruit by integration of antagonistic yeast with salicylic acid. *International Journal of Food Microbiology* 116:339- 345.

CONCLUSIONES GENERALES

El agente causal de la pudrición blanda o moho azul en el Estado de Chihuahua fue *Penicillium expansum*. El hongo fue identificado en base a las características morfológicas y moleculares.

El fenotipo de las colonias de los aislados en Extracto de malta-agar fue muy variable y no se utilizó como medida de identificación. Pero sí ayudó en la medición de las estructuras de todos los aislados.

La morfología de los 118 aislados provenientes del estado de Chihuahua fue discrepante.

La caracterización morfológica fue insuficiente para un diagnóstico certero por lo que se deben integrar en conjunto con la caracterización morfológica.

Los aislados de *Penicillium expansum* fueron los únicos patogénicos y agresivos.

Con el tiempo los frutos presentaron una pudrición blanda, acuosa, de color pardo claro, en la superficie aparece primero un moho blanco que luego se torna verde-azulado y produjo coremios en la superficie de algunos frutos.

Los aislados que mostraron diámetros de lesión igual o mayor del 81.3% fueron considerados altamente agresivos, entre 61.4 y 75.2% se consideraron moderadamente agresivos y los que presentaron 0%, se consideraron nulamente agresivos.

El 52% de los aislados analizados molecularmente dieron como resultado *P. expansum*, 44% *P. radicum* y solo el 4% *P. chrysogenum*.

A pesar de su utilidad, la identificación fenotípica implica un conjunto de diferentes pruebas que requieren mucho tiempo y labor intensiva. Esto representa un gran inconveniente de este enfoque para la identificación. Además, todos los ensayos fenotípicos son dependientes de la expresión de genes. Por ellos es importante recalcar la importancia de conjuntar la caracterización morfológica con la molecular para así concluir de manera más precisa a que especie no estamos refiriendo.