

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA  
DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO



Fitopatógenos Asociados al Cultivo de Frijol Soya  
*Glycine max* L. en el Sur de Sonora

Por:

**CRISTINA COLMENERO LÓPEZ**

TESIS

Presentada como Requisito Parcial para Obtener el Título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO EN PRODUCCIÓN**

Saltillo, Coahuila, México  
Diciembre 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA  
DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO

Fitopatógenos Asociados al Cultivo de Frijol Soya  
*Glycine max* L. en el Sur de Sonora

Por:

**CRISTINA COLMENERO LÓPEZ**

Presentada Como Requisito Parcial Para Obtener el Título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO EN PRODUCCIÓN**

Aprobada por el Comité de Asesoría:

---

Dr. Alberto Flores Olivas  
Asesor Principal

---

M.C. Jesús Antonio Cantúa Ayala  
Coasesor

---

Dr. Víctor Manuel Zamora Villa  
Coasesor

---

Dr. Gabriel Gallegos Morales  
Coordinador de la División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México  
Diciembre 2018

## AGRADECIMIENTOS

A **Dios**, por darme la vida y las oportunidades de lograr mis metas alcanzadas por protegerme de lo que creí que quería y por bendecirme con lo que no sabía que necesitaba.

A la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro**, por darme la oportunidad de estudiar dentro de sus aulas, la cual me abrió las puertas para formarme profesionalmente en el área de agronomía como ingeniero agrónomo en producción; gracias a mi Alma Mater por facilitarme sustento durante la carrera, así como todas las herramientas necesarias para culminar mis estudios.

Al **Dr. Alberto Flores Olivas**, por ser mi asesor principal, por su entrega en mi aprendizaje, por compartir su sabiduría y por impulsarme a ser cada día mejor, por su apoyo en inquietudes académicas para el fortalecimiento de mis conocimientos.

A mis **Asesores de Tesis**, por su dedicación y compromiso, por su aprendizaje y formar parte de mi titulación.

A la **MC. Flor Silvestre Hernández Hernández**, por ser la mejor maestra de mi vida, Gracias por toda su enseñanza, por su insistencia de mejorar, por compartir sus conocimientos, porque siempre se preocupó por mi preparación para desempeñarme en el ámbito profesional.

## DEDICATORIA

A mis padres, **J. Jesús Colmenero Rodríguez** y **Juana María López García**, por darme la vida y enseñarme a vivir. Gracias por darme la libertad de elegir mi futuro y brindarme con las manos abiertas su apoyo y confianza en mi preparación. Porque hoy recibo una de sus más valiosas herencias: mi profesión, por ustedes la obtuve y a ustedes se las brindo. Por su amor y paciencia, hoy ven forjado un anhelo, una ilusión y un deseo.

A mis hermanos, **Ricardo Colmenero López**, **Juan Jesús Colmenero López**, **Oscar Colmenero López** y **Jorge Colmenero López**, por cuidarme y protegerme de los peligros, por guiarme hacia el camino, con su apoyo a mi profesión y siempre estar conmigo todo momento, gracias por todo. Estoy muy agradecida.

A mis abuelos, **Fidencio Colmenero Soto** y **Tomasa Rodríguez Cruz**, fueron las personas después de mis padres que más se preocuparon por mí, y me encaminaron por el buen sendero.

A mi Amigo indispensable, **Moisés Rosas Tamayo**, por darme su amistad y comprensión cuando necesitaba de una persona, gracias por ser parte de mi vida, no dejarme sola en momentos difíciles y darme su apoyo moral.

A la familia **Barranco Lezama**, por ser parte de mi vida durante mi etapa de la Universidad, darme su apoyo moral como sus mejores deseos, agradecimientos, amistad y lo más importante su honestidad.

A **Julio Sergio Barranco Lezama**, por ser una de las personas importantes en mi vida, de quien aprendí tanto durante la etapa de mi formación profesional, y tantas cosas buenas. Siempre hay algo que agradecer o tal vez mucho, los buenos momentos, las risas, las alegrías compartidas y los mejores recuerdos.

## Contenido

DEDICATORIA.....	4
ÍNDICE DE CUADROS .....	7
ÍNDICE DE FIGURAS .....	8
RESUMEN .....	9
I.INTRODUCCIÓN .....	10
1.1 JUSTIFICACIÓN.....	11
1.2 OBJETIVO GENERAL .....	13
1.3 Objetivos específicos .....	13
1.4 Hipótesis .....	13
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	14
2.1 Etapas Fenológicas del cultivo de soya .....	14
2.1.1 Etapa vegetativa .....	14
2.1.1 Etapa reproductiva.....	14
2.2 Descripción Botánica de frijol soya ( <i>Glycine max L.</i> ) .....	16
2.3 Importancia del cultivo de soya.....	17
2.3.1 Producción mundial, nacional y estatal de soya. ....	17
2.4 Importancia política.....	18
2.5 Una ecología política de la producción de soya.....	18
2.6 Presencia de Fitopatógenos en soya.....	19
2.6.1 Hongos asociados a soya.....	19
2.6.2 Virus asociados a soya.....	23
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
3.1 Localización del cultivo. ....	26
3.2 Datos sobre las colectas de la muestras .....	27
3.3 Manejo de las muestras.....	27
3.4 Descripción de las muestras .....	28
.....	29
.....	29
3.5 Aislamiento e identificación de géneros de hongos y virus en cultivo de soya <i>Glycine max L.</i> .....	30
3.5.1 Estudio en laboratorio.....	30
3.5.2 Aislamiento de micelio. ....	30
3.5.3 Proceso de purificación. ....	31
.....	31

3.5.4 Caracterización de la cepa .....	31
3.5.5 Técnicas utilizadas en la identificación de hongos .....	32
3.5.6 Extracción de ADN .....	33
3.5.7 Extracción de ARN. ....	33
3.5.8 Detección de virus mediante PCR (ADN) y RT-PCR (ARN).....	34
IV.RESULTADOS Y DISCUSIÓN. ....	41
V. CONCLUSIÓN.....	47
VI.BIBLIOGRAFÍA.....	48

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de soya <i>Glycine max</i> L.....	16
Cuadro 2. Ubicación de lotes de soya establecidos en el estado de Sonora... 26	
Cuadro 3. Tipos de virus que atacan al cultivo de frijol soya. ....	34
Cuadro 4. Reactivos utilizados en la reacción 1 de RT-PCR (SMV).....	35
Cuadro 5. Reactivos utilizados en la reacción 2 de RT-PCR (SMV).....	35
Cuadro 6. Reactivos utilizados en la reacción de PCR (SMV).....	36
Cuadro 7. Programa de amplificación de PCR (SMV). ....	36
Cuadro 8. Reactivos utilizados en la reacción 1 de RT-PCR (TRSV). ....	37
Cuadro 9. Reactivos de utilizados en la reacción 2 de RT-PCR (TRSV). ....	37
Cuadro 10. Reactivos utilizados en la reacción de PCR (TRSV). ....	38
Cuadro 11. Programa de amplificación de PCR (TRSV).....	38
Cuadro 12. Reactivos utilizados en la reacción de PCR (BGMV). ....	39
Cuadro 13. Programa de amplificación de PCR (BGMV).....	39

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Valle de Yaqui, sur de Sonora. ....	27
Figura 2 Síntomas de muerte de plántula .....	28
Figura 3 Sintomatología de virosis.....	29
Figura 4 Síntomas de <i>Colletotrichum truncatum</i> en hoja .....	29
Figura 5 Síntomas de <i>Macrophomina phaseolina</i> en tallo: .....	30
Figura 6 Cepas de <i>Fusarium spp.</i> ....	31
Figura 7 Morfología microscópica de <i>Fusarium spp.</i> .....	42
Figura 8 Morfología microscópica de <i>Rhizoctonia spp.</i> .....	42
Figura 9 Detección del Virus Mosaico de la soya mediante RT- PCR. ....	43
Figura 10 Morfología microscópica de <i>Colletotrichum truncatum</i> .....	45
Figura 11 Morfología microscópica de <i>Cercospora spp.</i> .....	45
Figura 12 Morfología microscópica de <i>Macrophomina phaseolina</i> . ....	45



## RESUMEN

A partir del ciclo agrícola 2010 se inició la reactivación del cultivo de soya en el Valle del Yaqui, Sonora. Sin embargo diversos factores, entre ellos la presencia de enfermedades en el cultivo de soya han disminuido su establecimiento e incrementando su costo de producción. En la presente tesis se planteó el objetivo: identificar fitopatógenos asociados al cultivo de frijol soya *Glycine max* L. en el sur de Sonora. En diferentes etapas vegetativas y reproductivas del cultivo, se colectaron plantas que tuvieran síntomas de enfermedades. Se realizó el aislamiento e identificación de los patógenos por medio de técnicas tradicionales y moleculares. Se identificaron los siguientes hongos y virus: *Fusarium* spp. y *Rhizoctonia* spp., asociado a tejido blando y hundimiento en la base del tallo, causando muerte de plantas; *Macrophomina phaseolina*, pudrición carbonosa en la base del tallo; *Cercospora* spp., manchas en follaje y vainas; *Colletotrichum truncatum* (Schw.), lesiones en follaje, tallo y vainas; Virus Mosaico de la Soya (SMV) asociado a clorosis y arrugamiento en el follaje de soya.

**Palabras clave:** Soya, *Glycine max*, virus, aislamiento, PCR.

## I.INTRODUCCIÓN

La soya *Glycine max* L. es importante por su gran cantidad de usos, principalmente por su alto contenido de proteína en su grano con un 40% y una cantidad de aceite del 20%. El cultivo de frijol soya en el mundo es considerado una fuente muy importante de proteínas, el cual es utilizado en los alimentos nutritivos humanos y animales.

México es considerado el cuarto importador más importante de soya a nivel mundial, después de China, la Unión Europea y Japón. Se estima que México en 2015 importó 3.5 millones de toneladas (mdt), destinando 98% al sector pecuario, debido a que la producción es menor a su consumo (CNP, 2016).

En México del 2016 se encontró con una superficie sembrada  $249,814 \text{ t ha}^{-1}$  de las cuales se obtuvo una cosecha de 77 ton y una producción de  $270 \text{ t ha}^{-1}$  con un rendimiento de  $3.5 \text{ t ha}^{-1}$  de este año, a diferencia del 2017 con una superficie sembrada de  $243,505 \text{ t ha}^{-1}$  (SIAP, 2018).

En el año 2017 se satisface 10.54% de los requerimientos nacionales con producción interna, lo que establece una dependencia de importación de Estados Unidos, Paraguay y Brasil (SIAP, 2018).

El cultivo de soya es atacado por más de cien patógenos de los cuales aproximadamente 35 son de importancia económica. Las enfermedades en el cultivo son provocadas por agentes bióticos que alteran las funciones fisiológicas de las plantas, reduciendo generalmente los rendimientos y provocando la muerte; son conocidas como bacterias, hongos, virus, nematodos y fitoplasmas.

Las enfermedades más importantes que se presentan en el cultivo de soya son: damping-off (*Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp., *Phytophthora* spp. y *Pythium* spp.), pudrición carbonosa (*Macrophomina phaseolina*), ojo de rana (*Cercospora sojina*), mancha morada de la semilla (*Cercospora kikuchii*) y roya de la soya (*Phakopsora pachyrhizi*) (HSIPN, 2011).

## 1.1 JUSTIFICACIÓN

En el noroeste de México y específicamente en el sur de Sonora, a partir del ciclo agrícola 2010 se inició la reactivación del cultivo de soya en el Valle del Yaqui, Sonora, con la siembra de 860 hectáreas hasta llegar a 24000 hectáreas en el ciclo 2015, con rendimientos promedio de  $2.5 \text{ t ha}^{-1}$  y con agricultores líderes se llegan a obtener más de  $3.0 \text{ t ha}^{-1}$ . Para el 2016 se establecieron a 52000 hectáreas en el Sur de Sonora y alrededor de 5000 hectáreas en Sinaloa, sin embargo para el 2017 se establecieron 7000 mil hectáreas para el sur de Sonora. Las variedades predominantes han sido Nainari y Suaqui 86, en menor escala se ha utilizado la variedad Cajeme, (SIAP, 2018). Entre los factores que limitan el establecimiento del cultivo de soya en el sur de Sonora, las enfermedades son una de las principales limitantes para su producción.

La soya es de reciente reactivación en el padrón de cultivos del sur de Sonora, por lo que no existe información actualizada de los patógenos presentes en el cultivo. Sin embargo, en lotes de investigación en el Valle del Yaqui, durante el ciclo primavera-verano 2009 se mencionan las enfermedades detectadas en el cultivo de soya: *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp., *Phytophthora* spp. y *Pythium* spp., ocasionando pudrición de raíz y tallo, marchitamiento y muerte de plántulas; *Macrophomina phaseolina*, ocasionando detención del crecimiento, enanismo, maduración prematura, hojas cloróticas y muerte de plantas; *Cercospora sojina*, ocasionando manchas foliares que al unirse pueden ocasionar defoliación de las plantas (Ochoa *et al.*, 2011).

También en lotes de investigación en el Valle del Yaqui, durante el ciclo primavera-verano 2015, en la etapa vegetativa del cultivo de soya se reporta la enfermedad mancha de la hoja (*Alternaria* spp.) y mancha ojo de rana de la hoja (*Cercospora sojina*). En la etapa de madurez fisiológica y antes de la cosecha, se identificó pudrición carbonosa del tallo (*Macrophomina phaseolina*). También se observaron en las etapas de crecimiento vegetativo y reproductivo, síntomas de virosis como tizón de yemas y mosaicos en hojas; estos síntomas son similares a los que ocasionan los virus Tobacco Ringspot Virus (TRSV) y Soybean Mosaic Virus (SMV) en soya (Cantúa y Castillo, 2016).

La detección de estas enfermedades en el cultivo de soya en la región, y la presencia de síntomas como tizón de yemas, clorosis y mosaicos en hojas,

enanismo y tallo verde, los cuales son asociados a otros fitopatógenos que no han sido identificados; motivó el interés para iniciar ésta investigación, con el propósito de determinar al agente causal y actualizar la presencia de los fitopatógenos en el cultivo de soya en el sur de Sonora.

## **1.2 OBJETIVO GENERAL**

Identificar fitopatógenos asociados al cultivo de frijol soya *Glycine max* L. en el sur de Sonora.

## **1.3 Objetivos específicos**

Identificación de hongos asociados al cultivo de soya.

Identificación de virus asociados al cultivo de soya.

## **1.4 Hipótesis**

Al menos un tipo de hongo o virus se presenta en el cultivo de frijol soya, debido a que son los principales patógenos asociados al cultivo durante su desarrollo en el sur de Sonora.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Etapas Fenológicas del cultivo de soya

#### 2.1.1 Etapa vegetativa

Fehr *et al.*, (1971) describen las etapas fenológicas del cultivo de soya, los clasifica como etapa vegetativa y reproductiva:

Los dos primeros se identifican con letras.

VE-Emergencia. Se observa el hipocótilo, en forma de arco, empujando al epicótilo y a los cotiledones, haciéndolos emerger sobre la superficie del suelo.

VC-Etapa cotiledonar. El hipocótilo se endereza, los cotiledones se despliegan totalmente y en el nudo inmediato superior los bordes de las hojas unifoliadas no se tocan.

A partir de esta etapa, los estados vegetativos los identifica en base al número de nudos.

V1-(1er nudo). El par de hojas opuestas unifoliadas están expandidas totalmente, y en el nudo inmediato superior se observa que los bordes de cada uno de los folíolos de la 1er hoja trifoliada no se tocan.

V2-(2do nudo). La 1er hoja trifoliada está totalmente desplegada, y en el nudo inmediato superior los bordes de cada uno de los folíolos de la 2da hoja trifoliada no se están tocando.

Vn-(n= número de nudos). La hoja trifoliada del nudo (n) está expandida totalmente, y en el nudo inmediato superior los bordes de cada uno de los folíolos no se tocan.

#### 2.1.1 Etapa reproductiva

Fehr *et al.*, (1971) describen las etapas fenológicas del cultivo de soya, en la etapa reproductiva.

R1-Inicio de Floración. Se observa una flor abierta en cualquier nudo del tallo principal.

R2-Floración completa. Se observa una flor abierta en uno de los nudos superiores del tallo principal con hojas totalmente desplegadas.

R3-Inicio de formación de vainas. Una vaina de 5 milímetros de largo en uno de los cuatro nudos superiores del tallo principal, y con hojas totalmente desplegadas.

R4-Vainas completamente desarrolladas. Una vaina de 2 cm en uno de los cuatro nudos superiores del tallo principal con hojas totalmente desplegadas. En esta etapa comienza el periodo crítico del cultivo;

Entre R4 y R5 es el momento más crítico, ya que ha finalizado la floración y cualquier situación de estrés, déficit hídrico, de nutrientes, defoliación por orugas, enfermedades foliares, ataque de chinches, granizo, etc., afectará el número final de vainas y de granos, provocando la reducción del rendimiento.

R5-Inicio de formación de semillas. Una vaina ubicada en uno de los cuatro nudos superiores del tallo principal, contiene una semilla de 3 mm de largo.

R6-Semilla completamente desarrollada. Una vaina en cualquiera de los cuatro nudos superiores del tallo principal, contiene una semilla verde que llena la cavidad de dicha vaina, con hojas totalmente desplegadas. En esta etapa termina el período crítico del cultivo.

R7-Inicio de maduración. Una vaina normal en cualquier nudo del tallo principal ha alcanzado su color de madurez. La semilla, en este momento, contiene el 60 % de humedad.

R8-Maduración completa. El 95 % de las vainas de la planta han alcanzado el color de madurez. Luego de R8, se necesitan cinco a diez días de tiempo seco (baja humedad relativa del ambiente), para que las semillas reduzcan su humedad por debajo del 15 %.

## 2.2 Descripción Botánica de frijol soya (*Glycine max L.*)

Kantolic y Giménez (2006), mencionan que la planta de soya morfológicamente se define de la siguiente manera.

Tallo: Rígido y erecto, tiene una alturas de 0,4 a 1,5 metros, según las variedades y condiciones de cultivo.

Sistema radicular: la raíz principal puede alcanzar hasta un metro de profundidad, aunque lo normal es que no sobrepase los 40-50 cm. En la raíz principal o en las secundarias se encuentran los nódulos.

Hojas: Son alternas, compuestas, excepto las basales, que son simples. Son trifoliadas, con los foliolos oval-lanceolados. Color verde característico que se torna amarillo en la madurez, quedando las plantas sin hojas.

Flores: Son amariposadas y de color blanquecino o púrpura, según la variedad.

Fruto: Es una vaina dehiscente por ambas suturas. La longitud de la vaina es de dos a siete centímetros. Cada fruto contiene de tres a cuatro semillas.

Semilla: La semilla generalmente es esférica, del tamaño de un guisante y de color amarillo de 10 a 20 gramos.

### 2.2.1 Clasificación taxonómica.

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de soya *Glycine max L.*

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Fabales
Familia	Fabáceae (Leguminosa)
Sub-Familia	Faboideae
Género	<i>Glycine</i>
Especie	<i>Max</i>

Fuente: (Armas, 2012).



## 2.3 Importancia del cultivo de soya.

### 2.3.1 Producción mundial, nacional y estatal de soya.

La soya es la oleaginosa de mayor importancia en el mundo, tanto por los volúmenes comercializados como semilla, como por los importantes subproductos que se obtienen, y los que forman parte de una larga serie de cadenas agroindustriales (Coss, 2018).

En la actualidad, Estados Unidos es el principal productor de soya en el mundo con el 35% de la producción mundial de soya. Sin embargo el cultivo de soya en América del sur ha aumentado en los últimos años. Brasil, Argentina, Uruguay, Bolivia y Perú tienen el 50% de la producción mundial. (FAO, 2015).

De acuerdo con el SIAP (2018), la superficie sembrada con soya en México en 2015 fue de 250 mil hectáreas, la cual aumentó en relación con 2014 que fue de 211 mil  $ha^{-1}$ . No obstante, la producción fue menor en el primero (341 mil toneladas) en comparación con el segundo (350 mil toneladas), debido principalmente a la merma en el rendimiento ( $1.36 t ha^{-1}$ ), ya que en 2015 hubo sequía en la región más productora de soya en el país, el rendimiento en el año anterior fue de  $1.88 t ha^{-1}$  (SIAP, 2018).

En el año 2017 en México se produjeron 385,617 toneladas de soya, equivalentes aproximadamente al 5.0 % del consumo total nacional para ese año. El 75% de la producción se concentró en los estados de Tamaulipas (38%), Campeche (18%) y San Luis Potosí (19%), (SIAP, 2018).

De acuerdo al programa de desarrollo del INIFAP, 2018-2030; uno de los principales problemas de la soya en la etapa de producción primaria, que tiene una solución tecnológica integral y donde el instituto tiene las capacidades para proporcionar la solución, actual o futuro; menciona que el problema de enfermedades afecta adversamente la producción, la salud y el medio ambiente (INIFAP, 2018).

En el Sur de Sonora las temperaturas óptimas para el desarrollo de la soya están comprendidas entre los 20 y 30 °C, siendo las temperaturas próximas a 30 °C las ideales para su desarrollo. La siembra puede realizarse sobre suelo húmedo o seco. En húmedo, deposite la semilla a una profundidad de 6 a 8 centímetros, lo cual dependerá del tipo de suelo y su contenido de humedad.

La siembra en seco, es posible en terrenos de barrial, bien nivelados y teniendo cuidado extremos durante la siembra evitando que la semilla quede muy profunda o descubierta, esta debe entre 2 y 3 centímetros de profundidad. Se sugiere sembrar en surcos de 70 a 80 cm o en camas a doble hilera de 90 a 100 cm de ancho, con densidades de población de 25 a 30 plantas/ $m^2$ ; las menores densidades en fechas tempranas y las mayores en siembras tardías, dentro del periodo recomendado esto dependiendo del tamaño de semilla, se requieren de 60 a 80 kg/ha. Antes de iniciar la siembra se debe revisar el porcentaje de germinación y el vigor de la semilla, para adecuar la cantidad a utilizar. Evitar siembras desuniformes y con bajas poblaciones que es donde prospera mejor la mosquita blanca (Ochoa *et al.*, 2011).

#### **2.4 Importancia política**

La industria aceitera en México depende en gran medida de las importaciones de oleaginosas para elaborar sus productos; a partir de esto produce aceites que son utilizados por industrias de alimentos y finalmente distribuirse al consumidor final, sin embargo, la producción de soya en México ha caído considerablemente. De acuerdo con el SIAP-SAGARPA, en el año 2015 se consumieron a nivel nacional 4.06 millones de toneladas de soya, de las cuales 3.8 millones de toneladas fueron importadas; para el año 2017 la superficie cosechada de soya en México fue de 234,360 ha, con un rendimiento de  $1.645 t ha^{-1}$ , para una producción de 385,617 (SIAP, 2018).

Se requiere recobrar la competitividad del cultivo y el interés de los productores por la siembra del mismo, conociendo y haciendo un mejor manejo de las enfermedades se puede contribuir a recuperar la productividad y rentabilidad del cultivo.

#### **2.5 Una ecología política de la producción de soya.**

Con el conocimiento y manteniendo al cultivo libre de enfermedades, reduciendo el uso de pesticidas y con ello la contaminación del aire, suelo y agua.

## 2.6 Presencia de Fitopatógenos en soya.

### 2.6.1 Hongos asociados a soya.

***Macrophomina phaseolina*** (pudrición carbonosa del tallo). Es un hongo patógeno con amplio rango de hospedante y amplio rango de adaptación (Abawi., 1990). En México, se ha observado a *M. phaseolina* causando daños significativos en cultivos como ajonjolí (*Sesamum indicum* L.), berenjena (*Solanum melongena* L.), maíz (*Zea mays* L.), sorgo (*Sorghum bicolor* L.) y soya (*Glycine max* L.) en regiones áridas ((Díaz, 1992; Mayek- Pérez *et al.*, 1999; Hartman *et al.*, 1999).

*M. phaseolina* ocasiona la muerte de plántula de frijol en pre y post emergencia, o bien reduce el vigor de las plantas y el rendimiento de semillas de frijol (Abawi., 1990). Es un hongo que incluye diferentes especies de granos de interés agroeconómico, tales como legumbres y vegetales. Con una sintomatología y etiología: Para caracterizar síntomas y signos externos de la enfermedad, se seleccionan los tallos y raíces de las muestras enfermas (Abawi., 1990; Hartman *et al.*, 1999).

Se pueden observar síntomas de la enfermedad en todas las etapas del cultivo, en semilla infectada puede mostrar manchas negras de tamaño diverso en las rajaduras o sobre el tegumento; las semillas infectadas usualmente originan plántulas débiles que mueren a los pocos días. Las plántulas infectadas suelen mostrar una decoloración marrón rojiza en la porción emergente del hipocótilo. El área decolorada se torna marrón oscura o negra y las plántulas afectadas pueden morir bajo condiciones ambientales cálidas y secas. Las plantas inicialmente muestran síntomas no específicos, tales como menor tamaño de hojas, menor altura y otros relacionados a pérdida de vigor. A partir de floración aparecen los síntomas más característicos de la enfermedad. En los tejidos epidérmicos y subepidérmicos de las raíces y parte inferior del tallo se aprecia una coloración grisácea, provocada por la presencia de numerosos microesclerocios oscuros. Estos pequeños esclerocios no aparecen en cantidad hasta que las plantas comienzan a morirse, sugiriendo que su presencia implica la muerte de las células de los tejidos invadidos (Reyes, 2015).

***Fusarium spp.*** El género *Fusarium* es un grupo de hongos filamentosos ampliamente distribuidos en el suelo y plantas. Debido a su capacidad de crecer a 37°C son considerados oportunistas. De las más de 100 especies de *Fusarium* descritas, sólo 12 de ellas pueden considerarse fitopatógenos, entre ellas destacan *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* y *Fusarium verticilloides* (Hartman *et al.*, 1999).

Los síntomas se presentan en las raíces longitudinales mostrando una coloración rojiza en el hipocótilo y en la raíz primaria de la planta. Mientras más aumenta la infección todo el sistema radicular puede cubrirse de café rojizo superficial, en ocasiones se presentan raíces con fisura y hundidas. Si la raíz primero muere, la planta se observa marchita, achaparrada y con deformación prematura. Los síntomas se pueden llegar a confundir con deficiencia de fósforo, donde hay amarillamiento y marchites de las hojas inferiores. Las raíces muestran una coloración café rojiza que puede extenderse al tallo.

Microscópicamente, hifas hialinas septadas, delgadas y microconidias en acúmulos, la fiálide es generalmente fina, con forma de botella; simple o ramificada, cortas o largas; monofialídica (que emergen esporas de un poro de la fiálide) o polifialídica (de varios poros). Los macroconidios presentan forma de medialuna, hialinos y septados. Para su correcta clasificación es importante el largo, ancho, curvatura, septos, agrupaciones mucoides (esporodoquios). Los microconidios, ausentes en algunas especies, poseen variadas formas (fusiformes, ovals, clavadas, entre otras), agrupaciones (estructuras mucoides llamadas “falsas cabezas”), en cadenas largas o cortas (Verónica, 2011; Hartman *et al.*, 1999).

***Rhizoctonia spp.*** Las temperaturas óptimas para la infección entre 26-32 °C dependiendo del grupo de anastomosis. Este hongo de tierra provoca la podredumbre de las raíces y el cuello del tallo y plantas más jóvenes. Muestra manchas de color marrón rojizo en las hojas y el tallo. El hongo alcanza el cuello de la planta, donde se desarrolla un arco de patógeno en el tallo que ahoga a la cepa e impide que los nutrientes lleguen al resto de la planta, probando la muerte de la planta (Hartman *et al.*, 1999).

Se pueden observar filamentos cafés en el inferior y fuera del tallo los tallos tienen a romperse fácilmente.

***Phakopsora pachyrhizi*** (roya asiática). Los síntomas se visualizan principalmente en el envés de las hojas, como pequeñas lesiones de color amarillo-anaranjado, elevadas, tornándose marrón-rojizo a pálidas con el tiempo. Temperaturas por debajo de 28 °C, óptimo entre 16-24 °C, un mínimo de 6 horas de rocío y precipitaciones (Stewart *et al.*, 2013).

***Septoria glycines*** (mancha marrón o septoriosis). Las lesiones iniciales aparecen como puntos de color marrón oscuro sobre las hojas, variando desde el tamaño de la punta de un alfiler hasta áreas de varios centímetros cuadrados. Las manchas son angulares y presentan halo clorótico. La temperatura óptima es de 25 °C, con un rango de 15-30 °C, y de 6 a 36 horas de mojado foliar. Clima seco detiene el progreso de la enfermedad (Stewart *et al.*, 2013; Hartman *et al.*, 1999).

***Cercospora kikuchii*** (tizón de las hojas y mancha púrpura de la semilla). Los primeros síntomas aparecen luego de floración, las hojas superiores del cultivo expuestas al sol adquieren una coloración violeta, dándoles una apariencia de cuero bronceado. Las lesiones provocadas por el hongo son angulares, de pequeñas a 1 cm de diámetro. Temperaturas de 23-28 °C y prolongados períodos de alta humedad (Stewart *et al.*, 2013; Hartman *et al.*, 1999).

***Cercospora sojina*** (mancha ojo de rana). El hongo produce lesiones circulares en la hoja, de menos de 1 mm a 5 mm, oscuras con márgenes rojizos. A medida que va envejeciendo el centro de la lesión se torna gris o beige pálido. Temperaturas entre 25 y 35 °C (Stewart *et al.*, 2013; Hartman *et al.*, 1999).

***Diaporthe phaseolorum*** (cancro del tallo). El hongo infecta la planta, aparecen como pequeños puntos oscuros (1 a 2 mm de diámetro) que van evolucionando lentamente a lesiones alargadas de coloración castaño-rojiza (Stewart *et al.*, 2013; Hartman *et al.*, 1999).

***Colletotrichum truncatum*** (antracnosis). Es uno de los patógenos de plantas más importantes y de mayor distribución en el mundo, ya que ataca especialmente cultivos de regiones tropicales y subtropicales (Manners *et al.*,

2000; Waller and Rigde, 2000). La sintomatología se presenta en las hojas, pecíolos y tallos; inicialmente las hojas afectadas presentan puntos rojizos, las lesiones crecen en forma irregular y se unen entre sí ocasionando necrosis total de la hoja (Negrete y Redondo, 1997; Hartman *et al.*, 1999).

Si en las etapas reproductivas R3 y R4, se presentan en condiciones climáticas lluviosas, el hongo coloniza las vainas formando lesiones oscuras y reduciendo el número de las mismas. Al final del ciclo del cultivo, aparecen estructuras negras llamadas acérvulos (estructuras asexuales) con una disposición irregular a lo largo del tallo. Cuando se utiliza semilla colonizada por el hongo puede provocar muerte de plántulas en pre y pos emergencia. Los síntomas que presenta son manchas, pequeños puntos o círculos de color negro, presentes en todas las partes afectadas (Negrete y Redondo, 1997).

***Sclerotinia sclerotiorum*** (moho blanco o podredumbre húmeda del tallo). Se forman esclerocios, estructuras de resistencia del hongo, que pueden permanecer en los tejidos o en suelo y mantenerse viables por más de 8 años constituyendo el inóculo para futuras infecciones (Peluffo, 2010). Agente causal del moho blanco del poroto y las hortalizas, habitante del suelo, el cual produce estructuras de resistencia denominadas esclerocios en ausencia de los hospederos y/o en condiciones climáticas desfavorables. Infecta alrededor de 278 géneros y 408 especies de vegetales en todos los estadios de crecimiento y en productos cosechados (Allori *et al.*, 2016). La lesión se visualiza en los estados R2-R3 en los nudos inferiores del tallo, 10 a 50 cm por encima de la línea del suelo (Stewart *et al.*, 2013; Hartman *et al.*, 1999).

***Phytophthora sojae*** (pudrición). Presenta síntomas en planta adulta, consiste en el oscurecimiento de la base del tallo que avanza por las ramificaciones hasta el quinto o sexto entrenudo y contraste con los tejidos verdes superiores aun sanos; y posteriormente el marchitamiento; finalmente se produce la muerte de las plantas y las hojas están adheridas al tallo (Stewart *et al.*, 2013; Hartman *et al.*, 1999).

### **2.6.2 Virus asociados a soya.**

Los virus de las plantas difieren ampliamente de todos los demás fitopatógenos, no solo en tamaño y forma, sino también en su constitución química y estructura física, método de infección, propagación, translocación dentro del hospedero, diseminación y los síntomas que producen sobre el hospedero. Por su tamaño pequeño y a la transparencia de su partícula, los virus no pueden observarse ni detectarse mediante métodos utilizados para otros patógenos (Agris, 2005).

**Tobacco Ring Spot Virus (TRSV)** virus anillado del tabaco (muerte de la yema). Es una enfermedad más peligrosa de la soya con mayor importancia económica. Con frecuencia esta enfermedad se observa en los campos de cultivo rodeados de malas hierbas y junto a pastizales. La soya es atacada en cualquier etapa del cultivo, pero los daños son mayores cuando ocurre antes de la floración, ya que es factible la pérdida de la cosecha. Las infecciones después de esta etapa carecen de importancia económica (Stewart *et al.*, 2017).

Los síntomas son visibles de 20 a 30 días después de la emergencia de la plántula. Las plantas infectadas presentan un bronceado en las hojas trifoliadas, con una curva hacia debajo de la yema terminal. La yema se encuentra necrótica y quebradiza. La coloración oscura de la medula del tallo se puede apreciar cuando se corta longitudinalmente. También se puede observar la proliferación de hojas trifoliadas alargadas y pequeñas. Estas plantas pueden producir vainas, cuya semilla son pequeñas, manchadas y de mala calidad. El vector que puede transmitir el virus es *Frankliniella occidentalis* (Kaiser *et al.*, 1982).

**Soybean Mosaic Virus (SMV)** virus del mosaico de la soya. Es un virus filamentosos flexuoso, miembro del género *Potyvirus*, y perteneciente a la Familia *Potyviridae*. Su genoma está constituido por una cadena simple de (+) ARN de aproximadamente 9,6 Kb (Riechmann *et al.*, 1992). Este virus es transmitido por áfidos. También se transmite por semillas y las plantas originadas de esta forma juegan un papel importante en la epidemiología de la enfermedad, representando el inóculo primario. A escala experimental se transmite también por vía mecánica. Aunque los áfidos pueden adquirir el virus

de cualquier parte de la planta, la fuente más común y mejor para lograrlo son las hojas trifoliadas superiores y las del medio. Las plantas infectadas aparecen con hojas ampolladas, rugosas y deformadas, con un mosaico verde pálido distribuido en forma irregular sobre la hoja. Produce manchado de la semilla de color marrón oscuro en forma de montura alrededor del hilum (Stewart *et al.*, 2017). Los síntomas pueden variar dependiendo de la variedad de soya, la edad de la planta en el momento de la infección y las condiciones ambientales. Las hojas trifoliadas presentan un mosaico de zonas verdes claras y oscuras, que al pasar el tiempo pueden levantarse o arrugarse, especialmente a lo largo de las nervaduras. El manchado no indica necesariamente que el virus esté presente en esas semillas, ya que no todas las semillas manchadas lo contienen y además no todas las semillas de plantas infectas están manchadas (Martínez, 2006). Causa síntomas variables en las hojas, desde pequeños y a veces casi imperceptibles puntos cloróticos hasta grandes áreas cloróticas, mosaico suave o marcado, aclaramiento de nervaduras, deformación, ampollado y disminución del tamaño de la lámina foliar. En los tallos produce acortamiento de entrenudos y áreas cloróticas. Las vainas suelen ser más pequeñas, deformadas y menos pubescentes que las sanas. También produce deformación de flores, manchado de semillas, disminución del número y tamaño de la semilla (Brunt *et al.*, 1996).

**Bean Golden Mosaic Virus (BGMV)** virus del mosaico dorado del frijol. Este virus es transmitido por la mosca blanca (*Bemisia tabaci*). El género Begomovirus es el más diverso de la familia Geminiviridae, se encuentra distribuido en los cinco continentes infectando plantas dicotiledóneas. La transmisión se da por la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius), reconocida como un complejo de especies todavía en estudio, ya que no se pueden distinguir morfológicamente; (Boykin 2014; Firdaus *et al.*, 2012). Los síntomas causados por los begomovirus son diversos e incluyen: enanismo, mosaicos amarillo brillante, moteados cloróticos, clorosis foliar marginal, enrollamiento foliar, deformaciones foliares y arrugamientos de las hojas (Polston *et al.*, 1997). A nivel molecular, los begomovirus se caracterizan por un genoma de ADN simple banda, que se conforma de dos componentes genómicos nombrados A y B, con un tamaño aproximado de 2.5 a 3.0 kb cada uno; sin



embargo, existen algunas especies que carecen del componente B. El genoma de los begomovirus no codifica para una ADN polimerasa, por lo que es alta su dependencia hacia el huésped para poder replicarse (King *et al.*, 2012).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS.

#### 3.1 Localización del cultivo.

La presente investigación se realizó en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN) se localiza en Buenavista Saltillo Coahuila, México, en las coordenadas 25° 23 '42 '' de LN y 100° 50 '57 '' de LO y a una altura de 1754 msnm en donde se ubica el Laboratorio de Biología Molecular de Departamento de Parasitología. En el periodo junio-diciembre del 2017.

El cultivo de frijol soya se estableció en el sur del estado de Sonora, se localiza en las coordenadas 28° 30'35.66'' LN y 109° 27 '41.23 ''LO, a una altitud de 17-40 msnm (Figura 1). En diferentes municipios se establecieron cinco lotes de 10 hectáreas cada uno, utilizando la variedad Nainari (Cuadro 2).

Cuadro 2. Ubicación de lotes de soya establecidos en el estado de Sonora.

Municipio	LN			LO			Altitud
Lotes	°	'	''	°	'	''	msnm
Bacúm 305	27	27	53.61	110	03	28.9	21
Cajame 509	27	25	45.44	110	06	03.58	40
Cajame 605	27	25	09.50	110	03	28.79	40
Benito Juárez 1612	27	13	38.71	109	53	36.88	17
Benito Juárez 2224	27	07	02.18	109	47	43.1	17



Figura 1 Valle de Yaqui, sur de Sonora.

### **3.2 Datos sobre las colectas de la muestras.**

Durante el desarrollo vegetativo y reproductivo del cultivo de soya, junto con personal técnico de la Junta Local de Sanidad Vegetal del Valle del Yaqui; se visitaron diferentes predios de cultivo de soya, en la región Sur del Estado de Sonora. Se visitaron los predios siguientes: lote 305, 509, 605, 1612 y 2224. El sistema de producción es extensivo, a cielo abierto, suelo mayormente arcilloso, riego por gravedad, el manejo agronómico del cultivo es realizado por el productor.

### **3.3 Manejo de las muestras.**

Las muestras se recolectaron en diferentes lotes de cultivos de soya, a partir de observaciones de signos y/o síntomas de las enfermedades, se realizaron los muestreos durante diferentes etapas fenológicas y reproductivas del cultivo.

En cada uno de los lotes se tomaron de 1-10 plantas que se colocaron en bolsas de papel estraza, y se depositaron dentro de bolsas de plástico debidamente identificadas y puestas sobre gel congelado, en una hielera de unicel sellada para su envío a la Ciudad de Saltillo, Coahuila; y finalmente al laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), para su identificación.

### 3.4 Descripción de las muestras

Se realizó el primer muestreo el día 15 de Junio del 2017, en la etapa vegetativa de emergencia (VE) y etapa cotiledonar y primeras hojas unifoliadas (VC). Se colectaron plantas que tuvieran signos y/o síntomas de enfermedades, con presencia de síntomas visuales como: marchitamiento, tejido blando y hundimiento en la base del tallo causante de muerte de plántulas (Figura 2).

El segundo muestreo fue el día 11 de agosto del 2017, en la etapa reproductiva de floración completa (R2) e inicio de formación de vaina (R3); se colectaron plantas que tuvieran síntomas de virosis en el follaje (Figura 3). El tercer muestreo fue el 20 de septiembre del 2017, en la etapa reproductiva de maduración completa (R8); se colectaron plantas que tuvieran manchas, tizones y lesiones, en follaje, tallo y ramas de acuerdo con la (Figura 4 y 5).

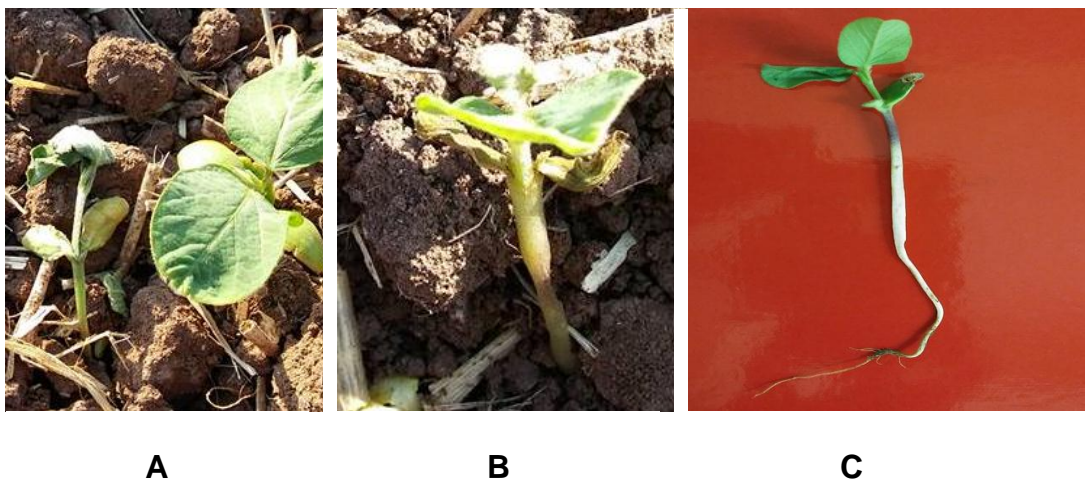


Figura 2 Síntomas de muerte de plántula : A-C) etapas vegetativas de emergencia y cotiledonar, presentando síntomas de marchitamiento, tejido blando y hundimiento en la base del tallo.



Figura 3 Sintomatología de virosis : La etapa R2 (floración completa) y R3 (inicio de formación de vaina), con síntomas de virosis; las plantas mostraron los peciolo acortados o intermedios con las venas de color verde oscuro y las hojas jóvenes con síntomas severos de amarillamiento.



Figura 4 Síntomas de *Colletotrichum truncatum* en hoja Los síntomas no son tan comunes como en tallos y vainas, pero se presentó generalmente en altas temperaturas, como necrosis en las nervaduras.



Figura 5 Síntomas de *Macrophomina phaseolina* en tallo: Se pueden observar los pequeños microesclerocios.

### **3.5 Aislamiento e identificación de géneros de hongos y virus en cultivo de soya *Glycine max* L.**

#### **3.5.1 Estudio en laboratorio**

Se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular UAAAN, en el que se realizó el aislamiento por la técnica de parte vegetativa (cortes histológicos) en medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA), Agua-Agar (AA) y jugo de verduras V8-Agar. El aislamiento se realizó utilizando una porción de tejido vegetal que presentara síntomas, ésta se desinfectó con una solución de hipoclorito de sodio (NaCl) al 2% y lavado con agua destilada estéril (1:2); una parte del tejido vegetal con signos y/o síntomas de organismos patógenos se sembraron en cajas Petri con medio de cultivo de PDA (39 gr/L) o AGUA AGAR (20 gr/L) y jugo de verduras V8-Agar.

La técnica se llevó a cabo en la campana de flujo en condiciones de asepsia, y posteriormente se colocó en cajas de Petri con los tres medios de cultivo mencionados, estableciendo dos repeticiones por medio de cultivo cada una de las cajas Petri se etiquetaron con los datos de cada lote y se incubaron a 25 °C durante 48 a 72 horas (figura 6). Una vez completado el desarrollo de los hongos se realizó una purificación y posterior identificación.

#### **3.5.2 Aislamiento de micelio.**

El aislamiento fue a partir de tejido vegetal enfermo donde es posible aislar a los patógenos, tomando un fragmento de micelio con pinzas estériles dentro de una campana de flujo laminar. El tejido vegetal se somete a una desinfección

superficial con una solución acuosa de hipoclorito de sodio, para posteriormente sembrarlos en los medios de cultivo.

### 3.5.3 Proceso de purificación.

La purificación de la cepa, se realizó de inóculos provenientes del aislado de la etapa anterior mediante la técnica de resiembras sucesivas en el medio de cultivo Agar-Agua (AA) y Papa Dextrosa Agar (PDA). Las cajas Petrí fueron colocadas en incubación a 25 °C durante cinco días (Figura 6).



Figura 6 Cepas de *Fusarium* spp. (Papa Dextrosa Agar), con un promedio de 1 a 3 días de desarrollo, colonia algodonosa, ilimitadas, de color blando o café. B) Cultivo de *Rhizoctonia* spp. PDA, con un promedio 1 a 3 días de desarrollo, colonia algodonosa.

### 3.5.4 Caracterización de la cepa

Una vez que se obtuvo el micelio puro se realizó la caracterización macro y microscópica de la cepa *in vitro* (Sánchez *et al.*, 2001). Para la caracterización macroscópica se utilizó un microscopio compuesto OLYMPUS. Dentro de las características macroscópicas se observaron cepas e hifas.

### **3.5.5 Técnicas utilizadas en la identificación de hongos**

En la caracterización de los organismos patógenos se utilizaron cuatro técnicas distintas.

1) Por observación de estructuras mediante cintazo (para hongos): se colocó una gota pequeña de agua sobre un portaobjetos, con un trozo de cinta adhesiva cortada de entre 3 a 5 cm de largo, teniendo cuidado de manipularlo solo por las orillas, se tocó con el lado adhesivo de la cinta la superficie donde se observaron los signos del hongo; con ayuda de microscopio estereoscópico junto con un mechero y en la campana de flujo, se pegó la cinta sobre el portaobjetos procurando que la gota de agua quedara en medio de la cinta, se observó al microscopio compuesto y se identificaron las estructuras visibles, se tomaron fotos de las estructuras; se realizó de nuevo la técnica cambiando la gota de agua por una gota pequeña de azul de lactofenol al 70 %.

2) Por observación de estructuras mediante raspado (para hongos): se colocó una gota pequeña de agua en un portaobjetos, se realizaron los raspados superficiales de las zonas afectadas con el filo de un bisturí, se colocó una gota de agua, y se colocó con cuidado un cubreobjetos, se observó al microscopio compuesto y se identificaron las estructuras visibles, se tomaron fotografías de las estructuras; se realizó de nuevo la técnica cambiando la gota de agua por una gota pequeña de azul de lactofenol al 70 %.

3) Por observación de estructuras mediante corte y disección de tejidos (para hongos): se localizó bajo el microscopio estereoscópico el signo del hongo patógeno, se mojó el tejido con una gota de agua, se tomó el tejido con los dedos pulgar e índice para que no se mueva y se realizó un corte lo más delgado posible de arriba abajo con el bisturí, se tomó el corte realizado y se colocó en un portaobjetos donde se había puesto previamente una gota de azul de lactofenol al 70% o agua, se colocó con cuidado un cubreobjetos, se calentó unos segundos hasta que la solución vaporizó un poco para eliminar el aire contenido dentro del tejido, se observó al microscopio y se identificaron las estructuras visibles, se tomaron fotografías de las estructuras.



### **3.5.6 Extracción de ADN**

La técnica de extracción de ADN se realizó para detección de virus (Cuadro 3). Consistió en utilizar una solución de extracción, utilizando 160g de tejido vegetal (305, 509, 1612, 2224, 605) al cual se agregó la solución de extracción esto fue depositado en un mortero para después incubar a 65°C por 45 min, utilizando 500 µl de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1 (frio), posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm/15 min, se recuperó la fase acuosa agregándole cloroformo isoamílico 24:1 agitando por inversión y centrifugando a 12,000 rpm/10 min. Se recuperó la fase acuosa que se dejó reposando durante toda la noche, se centrifugó a 12,000 rpm/10 min, posteriormente se decantó y lavo la pastilla con etanol al 70% (frio) a 500 µl a 12,000 rpm/15 min. Se dejó secar la pastilla y para resuspender con 30 µl de agua inyectable, a continuación se almacenó el ADN a -20 a °C.

### **3.5.7 Extracción de ARN.**

La técnica de extracción de ARN se realizó para detección de virus (Cuadro 3). Se utilizaron 150 g de tejido vegetal con 1.5 ml de buffer lisis en un mortero, inmediatamente se agrega a tubos etiquetados (305, 509, 1612, 2224, 605), se centrifugó a 2600 rpm/5 min. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo agregándole un mismo volumen de etanol al 100%, se mezcló en vortex, se transfirieron 700 µl a un tubo de spin cartridge, y centrifugando a 12,000 rpm/15 min, se llevó el fluido a otro tubo spin cartridge, agregando 700 µl de Buffer de lavado I y centrifugando a 12,000 rpm/15 segundos.

Se decantó a un tubo spin colector agregándole 500 µl de Buffer de lavado II con etanol. Centrifugamos a 12,000 rpm/15 segundos, se decantó el fluido para volver agregar Buffer de lavado II con etanol y centrifugamos a 12,000 rpm/15 segundos, recuperando el fluido a un tubo colector y centrifugamos a 12,000 rpm/1 minuto, al finalizar adicionamos 30 µl de agua libre de RNasas al centro del tubo spin cartridge, incubando 1minuto y centrifugamos a 12,000 rpm/2 minutos a temperatura ambiente, posteriormente almacenando el ARN a -20 a °C.

Cuadro 3. Virus que atacan al cultivo de frijol soya.

VIRUS	EXTRACION
Tobacco Ring Spot Virus (TRSV) Virus anillado del tabaco	ARN
Soybean Mosaic virus (SMV) Virus del mosaico de la soya	ARN
Bean Golden Mosaic Virus (BGMV) Virus del mosaico dorado del frijol	ADN

### 3.5.8 Detección de virus mediante PCR (ADN) y RT-PCR (ARN).

La reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction, PCR) (Castro, 2011) permite la amplificación de secuencias específicas de ADN, generando millones de copias a partir de una sola molécula de ADN, en los virus (Tobacco Ring Spot Virus, Soybean Mosaic Virus y Bean Golden Mosaic Virus).

Se realizaron las extracciones de ARN, para posteriormente realizar RT-PCR bajo la metodología siguiente:

Se colocaron 5 µl de ARN de la muestra en tubos de microcentrífuga de 200 µl y se incubaron en un termociclador THERMO ELECTRON CORPORATION PX2 THERMAL CYCLER, a una temperatura de 65 °C durante 2 minutos.

Posteriormente se colocó en hielo por 5 minutos, mientras se preparó la mezcla de reacción para RT como se indica en los cuadros 4 y 5.

Cuadro 4.Reactivos utilizados en la reacción 1 de RT-PCR (SMV).

Reactivo	Cantidad
Agua	4.0 $\mu$ l
ARN de la muestra	5.0 $\mu$ l
OLIGO (dt)2 primer (10 $\mu$ l).	2.0 $\mu$ l
Primer SMV CPR 10 pmoles.	1.5 $\mu$ l
Total	12.5 $\mu$ l

Se incubo en el termomix a 65 °C por 2 minutos.

Cuadro 5.Reactivos utilizados en la reacción 2 de RT-PCR (SMV).

Reactivo	Cantidad
Reacción buffer MMLVRT 10X	2.0 $\mu$ l
DTT Mm	2.0 $\mu$ l
DNTP premix	2.0 $\mu$ l
Ribo Guard Rnase Inhibitor	0.5 $\mu$ l
MMLV REVERSE TRANSCRIPTASA	1.0 $\mu$ l
Total	20.0 $\mu$ l

Se mezclaron las reacciones 1 y 2. Se sintetizó la reacción a 37°C por 60 minutos y 85°C por 5 minutos. Se colocaron en hielo.

Cuadro 6. Reactivos utilizados en la reacción de PCR (SMV).

Reactivo	Cantidad
Tax mix 2	25.0 $\mu$ l
Primer SMV CPF 10 pmoles	1.0 $\mu$ l
Primer SMV CPR 10 pmoles	1.0 $\mu$ l
Agua	18.0 $\mu$ l
cADN de la muestra	5.0 $\mu$ l
Total	50 $\mu$ l

Cuadro 7. Programa de amplificación de PCR (SMV).

Condiciones de temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial 94 °C	2 min	1
Desnaturalización 94 °C	30 seg	
Alineamiento 55 °C	30 seg	40
Extensión 68 °C	1 min	
Extensión final 68 °C	5 min	1

Cuadro 8. Reactivos utilizados en la reacción 1 de RT-PCR (TRSV).

Reactivo	Cantidad
Agua	4.0 $\mu$ l
ARN de la muestra	5.0 $\mu$ l
OLIGO (dt)2 primer (10 $\mu$ l).	2.0 $\mu$ l
Primer MFOS-21-R 10 pmoles.	1.5 $\mu$ l
Total	12.5 $\mu$ l

Se incubo en el termomix a 65 °C por 2 minutos.

Cuadro 9. Reactivos de utilizados en la reacción 2 de RT-PCR (TRSV).

Reactivo	Cantidad
Reacción buffer MMLVRT 10X	2.0 $\mu$ l
DTT mM	2.0 $\mu$ l
DNTP premix	2.0 $\mu$ l
Ribo Guard Rnase Inhibitor	0.5 $\mu$ l
MMLV REVERSE TRANSCRIPTASA	1.0 $\mu$ l
Total	20.0 $\mu$ l

Se mezclaron las reacciones 1 y 2. Se sintetizo la reacción a 50 °C por 30 minutos y 95 °C por 5 minutos. Se colocaron en hielo.

Cuadro 10. Reactivos utilizados en la reacción de PCR (TRSV).

Reactivo	Cantidad
Tax mix 2	25.0 $\mu$ l
Primer MF05-22-F 10 pmoles	1.0 $\mu$ l
Primer MF05-21-R 10 pmoles	1.0 $\mu$ l
Agua	18.0 $\mu$ l
cADN de la muestra	5.0 $\mu$ l
Total	50 $\mu$ l

Cuadro 11. Programa de amplificación de PCR (TRSV).

Condiciones de temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial 94 °C	15 min	1
Desnaturalización 94 °C	30 seg	
Alineamiento 50 °C	1 min	35
Extensión 72 °C	1 min	
Extensión final 72 °C	10 min	1

Cuadro 12. Reactivos utilizados en la reacción de PCR (BGMV).

Reactivo	Cantidad
Tax mix 2	25.0 µl
Primer BGMB F3 10 pmoles	1.0 µl
Primer BGMB R2 10 pmoles	1.0 µl
Agua	21.0 µl
cADN de la muestra	2.0 µl
Total	50 µl

Cuadro 13. Programa de amplificación de PCR (BGMV).

Condiciones de temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial 94 °C	5 min	1
Desnaturalización 94 °C	1 min	
Alineamiento 54 °C	1 min	35
Extensión 72 °C	3 min	
Extensión final 72 °C	6 min	1

Los primers utilizados fueron:

Tobacco Ringspot Virus (TRSV)

MF05-22-F (5'-CAGGGGCGTGAGTGGGGGCTC-3')

MF05-21-R (5'-CAATACGGTAAGTGCACACCCCG-3'), Kundu *et al.*, 2015.

Soybean Mosaic Virus (SMV)

SMV-cpf: (5'-CAAGCAGCAAAGATGTAAATG-3')

SMV-cpr: (5'-GTCCATATCTAGGCATATACG-3'), Ahangaran *et al.*, 2009.

Bean Golden Mosaic Virus (BGMV)

BGMB-F3 (TGTGTCCTTTGATGAACG)

BGMB-R2 (CTCAGTTAGCAAATCCTCC), McMillan *et al.*, 1998.

Se colocaron los tubos en el termociclador, previamente programado de acuerdo a las condiciones de temperatura indicadas. Finalizado el programa del termociclador se retiraron los tubos y se almacenaron a 4 °C hasta que se efectuó la electroforesis.

Se realizó la electroforesis bajo la metodología siguiente: se disolvieron 0.5 g de agarosa en 50 ml Buffer Tae 1X, se dejó enfriar hasta una temperatura aproximada de 50 °C y se vació en un molde dentro de la cámara de electroforesis para realizar el gel de agarosa y se le agregó 5 µl bromuro etidio, cuando se solidificó el gel se añadió a la cámara de electroforesis Buffer Tae 1X hasta cubrir el gel, se adicionaron 5 µl de producto de PCR y 5 µl de buffer de carga dentro de los pozos del gel de agarosa, también en otro pozo se adicionaron 3 µl de un marcador de peso molecular de referencia de 50 pares de bases y otro de 1 kb, se realizó la electroforesis a 80 voltios por un tiempo de 60 minutos, finalmente se pasó el gel al transluminador con luz ultravioleta y se foto documentó el fragmento amplificado.



#### **IV.RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

Del muestreo realizado en la etapa vegetativa de emergencia (VE) y etapa cotiledonar y primeras hojas unifoliadas (VC); y de acuerdo a las características morfológicas observadas de los aislamientos realizados, se identificaron dos géneros de hongos. *Fusarium* spp., presentando micelio blanco y captado, tipo algodonoso; conidióforos variables, ramificados irregularmente; conidias hialinas, presentando conidias intermedias de 2 a 3 células, de forma oblonga o ligeramente curvadas; microconidias de una célula ovoide u oblonga (Figura 7). *Rhizoctonia* spp., presentando micelio ramificado en ángulo recto y tabicado, uniforme distribuido por la superficie del hospedero, con ausencia de conidias (Figura 8). Estos patógenos se encuentran asociados a síntomas de tejido blando y hundimiento en la base del tallo o partes que se encuentran bajo el suelo; y finalmente causando muerte de plántulas en el cultivo de soya (Barnett and Hunter, 1988; Agrios, 2005; Mueller *et al.*, 2010).

La identidad y frecuencia de detección de los dos géneros de hongos se presentó de la siguiente manera: *Fusarium* spp., lotes 305, 509 y 605; *Rhizoctonia* spp., lotes 305, 1612 y 2224; ambos patógenos con 60% de frecuencia de detección. Lo anterior hace suponer que los géneros de hongos *Fusarium* spp. y *Rhizoctonia* spp., se encuentran de manera prevalente en el sur de Sonora, en el área donde se colectó el material vegetal; concordando con lo reportado por Ochoa *et al.* 2011, donde mencionan a éstos patógenos como causantes de enfermedades detectadas en el cultivo de soya durante el ciclo primavera-verano 2009, en el Valle del Yaqui, sur de Sonora.

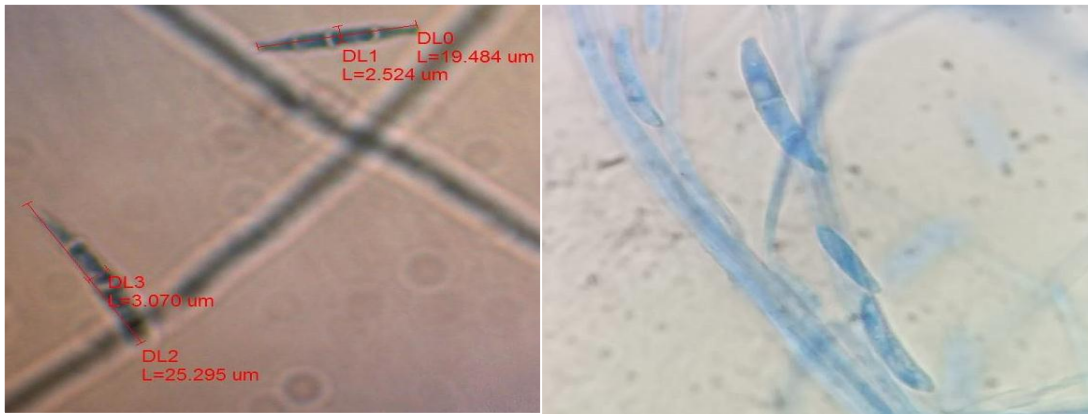


Figura 7 Morfología microscópica de *Fusarium* spp : preparación con azul de lactofenol a 100X en microscopio compuesto.

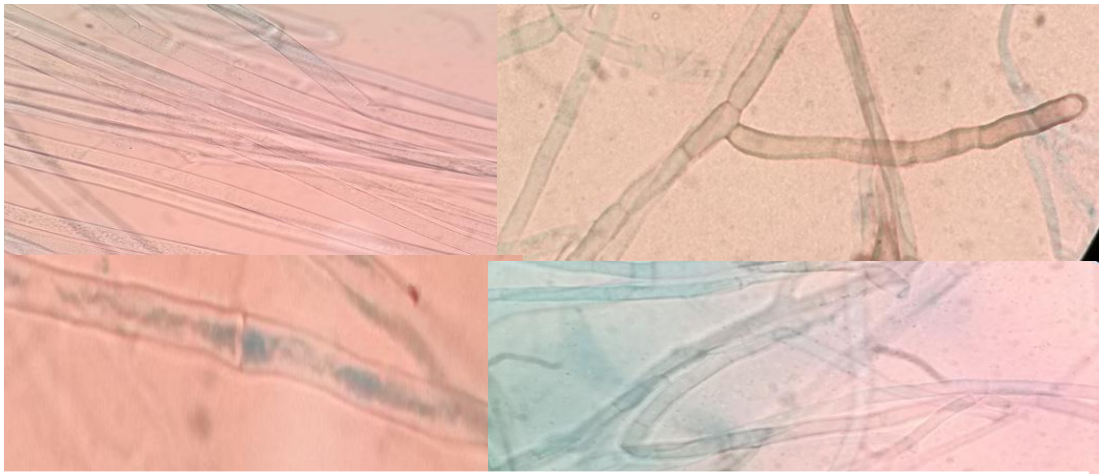


Figura 8 Morfología microscópica de *Rhizoctonia* spp : preparación con azul de lactofenol a 100x en microscopio compuesto

Del muestreo realizado en la etapa reproductiva de floración completa (R2) e inicio de formación de vaina (R3), y a los resultados obtenidos por medio de la técnica molecular de RT-PCR (ARN), se identificó al virus mosaico de la soya (SMV). Se muestran los resultados de la electroforesis en gel de agarosa del producto de RT-PCR, donde la amplificación del fragmento esperado de 469 pb, indicó la presencia de SMV en las muestras obtenidas de los lotes 509, 605 y 1612, en los carriles 2, 3 y 4 respectivamente (figura 9).

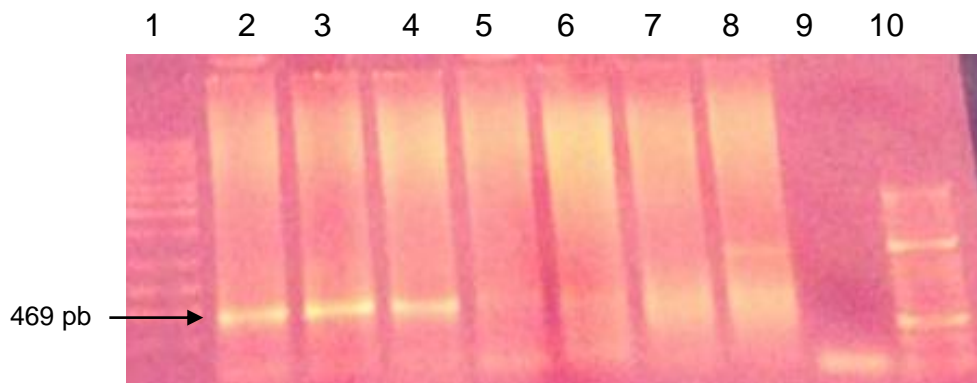


Figura 9 Detección del Virus Mosaico de la soya mediante RT- PCR. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular 1 kb (Invitrogen); los carriles 2, 3 y 4 representan muestras positivas para SMV; los carriles 5-8 representan muestras negativas para SMV; el carril 9 representa al testigo negativo; el carril 10 corresponde al Marcador de peso molecular 50 pb (Invitrogen).

Éstos resultados confirman lo reportado por Cantúa y Castillo, 2016.; quienes reportan en lotes de investigación en el Valle del Yaqui, durante el ciclo primavera-verano 2015, síntomas de virosis como tizón de yemas y mosaicos en hojas, similares a los que ocasionan los virus Tobacco Ringspot Virus (TRSV) y Soybean Mosaic Virus (SMV) en soya.

Lo anterior hace suponer que el virus mosaico de la soya (SMV) se encuentra de manera prevalente en el sur de Sonora. La detección del virus mosaico de la soya (SMV) es relevante, pues éste virus presenta como vector insectos de la familia *Aphididae*, incluye 34 especies, donde el pulgón *Myzus persicae* lo

trasmite de forma no persistente, también se trasmite mecánicamente y por semilla donde las plantas originadas juegan un papel importante en la epidemiología de la enfermedad, representando el inóculo primario. También en ensayos de mantenimiento y propagación del SMV, se reporta además de soya al frijol *Phaseolus vulgaris*. La importancia del SMV es debido a que reduce el número de vainas y semillas, pérdidas de rendimiento del 8 al 35 % y hasta 90 % en materiales susceptibles y reduce la calidad de la semilla, provocando un moteado y baja germinación (Agrios, 2005; Mueller *et al.*, 2010; PVO, 2018).

También por medio de la técnica molecular de RT-PCR (ARN), se realizaron análisis para el virus estriado del tabaco en soya (TRSV), siendo el resultado negativo. Así mismo, utilizando la técnica molecular de PCR (ADN), se realizaron análisis para el virus del mosaico dorado del frijol (BGMV), siendo el resultado negativo.

Del muestreo realizado en la etapa reproductiva de maduración completa (R8), y de acuerdo a las características morfométricas observadas, se identificaron 3 géneros de hongos. Se identificaron a los hongos *Colletotrichum truncatum*, presentando acérvulos de forma oval a alargada, errumpentes, con setas cortas a largas de 60 a 300 x 3 a 8  $\mu\text{m}$ ; conidióforos simples, alargados; conidias hialinas, de 1 célula, de forma ovoide a curvada, de 17 a 31 x 3 a 4.5  $\mu\text{m}$  (Figura 10). *Cercospora* spp., presentando conidióforos que producen conidios alargados, filiformes, en forma de mazo, simples o septados, con 0-5 septos transversales y de 35-75 x 2.5-5.0  $\mu\text{m}$  (Figura 11). *Macrophomina phaseolina*, presentando microesclerocios pequeños, globosos, de color negro, cuerpos numerosos, con color negro-grisáceo en el tejido.



Figura 10 Morfología microscópica de *Colletotrichum truncatum*.

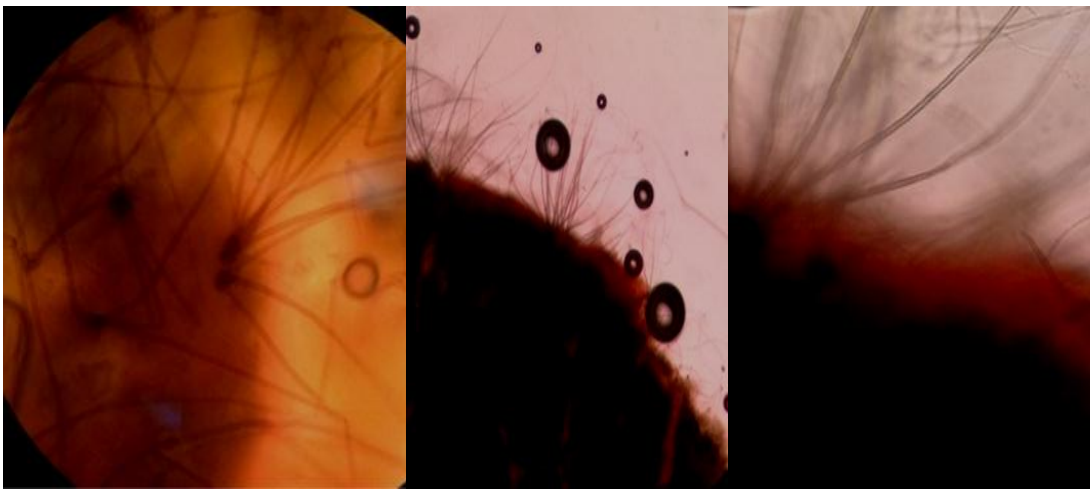


Figura 11 Morfología microscópica de *Cercospora* spp.



Figura 12 Morfología microscópica de *Macrophomina phaseolina*.

Los géneros de *Colletotrichum truncatum*, *Cercospora* spp. y *Macrophomina phaseolina*, fueron detectados en los lotes 305, 509, 606, 1612 y 2224, con una frecuencia del 100%. Lo anterior hace suponer que se encuentran de manera prevalente en el sur de Sonora; concordando con lo reportado por Ochoa *et al.*, 2011, y por Cantúa y Castillo, 2016; quienes mencionan a *Cercospora* spp. y *Macrophomina phaseolina* como causantes de enfermedades en el cultivo de soya en el Valle del Yaqui, sur de Sonora.

Estos tres patógenos son parásitos del follaje, tallo y vainas de las plantas, ocasionan que en el tejido vegetal afectado se presenten amarillamiento, arrugamiento, manchas y necrosis; en infestaciones muy severas pueden ocasionar baja producción y muerte de plantas en el cultivo de soya (Barnett and Hunter, 1998; Agrios, 2005; Mueller *et al.*, 2010).

Con los resultados obtenidos del presente estudio se abren nuevas líneas de investigación, como determinar incidencia, severidad y pérdidas de rendimiento en la producción, ocasionados por los patógenos encontrados. Determinar si las especies de áfidos en la región actúan como vectores de virus de la soya hacia las malezas u otros cultivos o viceversa; así también, determinar la presencia de otros virus que infectan al cultivo de soya. Esta información es fundamental para la implementación de estrategias de manejo de enfermedades, donde se utilice un manejo integral, incluyendo el genético como pureza varietal y fitosanitaria; cultural, utilizando semilla libre de patógenos, fechas de siembra, áreas libres de malezas y rotación de cultivos; biológico, utilizando organismos antagónicos a los vectores, cultivos trampa; químico, utilizando insecticidas bioracionales y jabones para control de vectores. Lo anterior para coadyuvar en aumentar los rendimientos de frijol soya *Glycine max* L. en el sur de Sonora, porque el mercado mexicano requiere de una mayor productividad para lograr abastecer la demanda que la industria requiere.

## **V. CONCLUSIÓN**

Se logró identificar al hongo *Colletotrichum truncatum* (Schw.), asociado a lesiones y manchas irregulares de color café oscuro en el follaje, tallo y vainas del cultivo de soya, en el sur de Sonora; ciclo agrícola primavera- verano 2017. También con la identificación de sus características morfométricas, se evidencio la presencia de hongos del género *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp., como patógenos asociados a síntomas de marchitamiento, tejido blando y hundimiento en la base del tallo en plántulas de soya; *Cercospora* spp. asociado a manchas en el follaje y vainas; y *Macrophomina phaseolina* a pudrición carbonosa en la base del tallo.

En el sur de Sonora no hay reportes previos de *Colletotrichum truncatum* (Schw.), como agente causal de antracnosis en el follaje de soya; por lo tanto los resultados obtenidos nos aportan información para establecer un adecuado programa fitosanitario en el cultivo de soya.

Se determinó la identificación del virus mosaico de la soya (SMV), a partir de síntomas de clorosis y arrugamiento en el follaje de soya, en el sur de Sonora; y se estandarizaron los protocolos utilizados para la extracción de ARN y de la técnica molecular de RT-PCR del SMV.

La detección del virus mosaico de la soya (SMV) por medio de la técnica molecular de Reversa Transcriptasa-Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR), con los oligos SMV-CPf y SMV-CPr, y una amplificación del fragmento esperado de 469 pb; nos sugiere que debería hacerse una secuencia completa de su genoma, para realizar una asociación más específica del SMV y del cultivo de soya en el sur de Sonora.

## VI. BIBLIOGRAFÍA

- Abawi G S, 1990. Diagnóstico, metodologías de investigación y estrategias de gestión. Centro internacional de agricultura tropical. Cali.Colombia. raíces del frjol.114 p.
- Agrios, G.N. 2005. Fitopatología de plantas. Elsevier Academic Press. 5° Edition, San Diego, California, U. S. A. 921pp. <http://biblioteca.utsem-morelos.edu.mx/files/asp/biologia/FITOPATOLOGIA%20-%20George%20N-Agrios.pdf>
- Ahangaran, A., Gh. Mosahebi M.G., Koohi H.M., Khezri, S. and Shahraeen, N. 2009. Uso de métodos rápidos a base de ácido nucleico y serológico para detectar el virus del mosaico de la soya. J. Agric. Sci. Tecnol (2009) Vol. 11: 91-97.
- Allori Stazonelli, E., Yasem de Romero, M. G., & Ploper, L. D. 2016. Evaluación in vitro de la influencia de la temperatura en la germinación carpogénica de *Sclerotinia sclerotiorum* nativo del Noroeste Argentino. Revista agronómica del noroeste argentino, 36(1), 51-56.
- Arias, N., & Andrian, M. Control de enfermedades en el cultivo de soja. Boletín técnico. EEA Concepción del Uruguay. Serie producción vegetal, (50).
- Barnett, H.L. and Hunter, B.B. 1998. Géneros ilustrados de hongos imperfectos, Cuarta edición, APS PRESS. La Sociedad Americana de Fitopatología. San Pablo, Minnesota 217pp.
- Boykin, L. M. (2014). La nomenclature de *Bemisia tabaci*: ciencia del manejo de plagas y lecciones, 70, 1454-1459.
- Cabrera, María G. - Gutiérrez, Susana A. - Alvarez, Roberto E. Raimondo, Mariano R. Gómez, Diana E. 2001. Cátedra de Fitopatología - Facultad de Ciencias Agrarias - UNNE. Sargento Cabral 2131 - (3400) Corrientes - Argentina.
- Cantúa, A.J.A. y Castillo, T.N. 2016. Enfermedades del cultivo de soya (*glycine max*) en el sur de sonora. Memorias del XVIII Congreso Internacional y XLIII Nacional. Sociedad Mexicana de Fitopatología, 2016. Mazatlán, Sinaloa.
- Carlos reyes. (2015). Pudrición por *Macrophomina* - *Macrophomina phaseolina*. Panorama agro.com, 1, 1.
- De Castro, A. M. P. (2011). Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR).
- Díaz F A 1992. Evaluación de genotipos de frijol e influencia de la temperatura con relación a la pudrición carbonosa. Agric. Tec. Méx.18:3-10.



- Fehr W., C. Caviness, D. Burmood y J. Pennington. 1971. Stage of development descriptions for soybeans, glycine max (L.) Merrill. Crop Science. Vol 11: 929-93.
- Firdaus, S., Vosman, B., Hidayati, N., Jaya, E. D., Visser, R., y vanHeusden, A. H. (2012). El complejo de especies de Bemisia tabaci: adición en diferentes partes del mundo. Insect Science, 00, 1-11. doi: 10.1111 / 1744-7917.12001.
- Hartman, G.L., Singlair, J.B. and Rupe, J.C.1999. Compendium of soybean diseases, 4 th edn, St. Paul, Minnesota: APS Press.
- HSIPN, 2011. Hub sistema pacifico Norte. Centro de Investigación Regional del Noroeste.
- INIFAP, 2018. Programa de desarrollo del INIFAP, 2018-2030.
- Kantolic, A., P. Giménez; E. de la Fuente 2006. Capítulo 2.2: Soja En: Cultivos Industriales. 1ra edición. Ed: E. de la Fuente et al., Buenos Aires. pp 95-141.:
- King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., & Lefkowitz, E.J. (2012). Clasificación taxonomía de virus y nomenclatura. Noveno informe del Comité Internacional sobre Taxonomía de Virus. Estados Unidos de América.
- Kundu J.K., Gadiou S., Schlesingerová G., Dziaková M., Čermák V. 2015. Emergence of quarantine Tobacco ringspot virus *in Impatiens walleriana* in the Czech Republic. Plant Protect. Sci., 51: 115–122.
- Lucila Peluffo,. 2010. Caracterización de los mecanismos de defensa a sclerotinia sclerotiorum, agente causal de la podredumbre del estudio de perfiles metabólicos y transcripcionales (tesis de doctorado, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires).
- Martínez González, E.; Barrios Sanromá G.; Rovesti L y Santos Palma R. 2006. Manejo Integrado de Plagas. Manual Práctico. Centro Nacional de Sanidad Vegetal (CNSV), Cuba.
- Mayek-Pérez, N., López-Castañeda, C., García-Espinosa, R., Martínez-De la Vega, O., Acosta-Gallegos, J.A. 1999. Variación in vitro de aislamientos Mexicanos de Macrophomina phaseolina. Revista Mexicana de Fitopatología 17:83-90.
- Mueller D., Robertson A., Sisson A. and Tylka, G. 2010. Soybean Diseases. Iowa State University. CSI 0004 November 2010
- Ochoa, E.X.M., Cantúa, A.J.A., Aguilera, M.N.A. y Montoya, C.L. 2011. Guía para producir soya en el sur de Sonora. INIFAP-CIRNO. Campo Experimental Norman E. Borlaug. Folleto para productores Núm. 41. Ciudad Obregón, Sonora, México. 32.

- Polston, J. E., & Anderson, P.K. (1997). La aparición de geminivirus transmitidos por la mosca blanca en el tomate en el hemisferio occidental. *Enfermedades de las plantas*, 81(12), 1358-1369.
- Riechmann JL, Lain S, Garcia JA. 1992. Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *Journal of General Virology*, 73: 1-16.
- Sherepitko, D. V., Budzanivska, I. G., Polischuk, V. P., y Boyko, A. L. (2011). Partial sequencing and phylogenetic analysis of Soybean mosaic virus isolated in Ukraine. *Biopolymers and Cell* 27, 472-479.
- SIAP, 2018. Servicio de Información Agrícola y Pecuaria. Avance de Siembras y Cosechas Resumen nacional por estado de Sonora.
- Stewart, S. *et al.* 2013- Manual de identificación de enfermedades de la soya - INIA, BD 104. Instituto nacional de investigación agropecuaria Uruguay.
- Waller, J. M. And Bridge, P. D. 2000. Recent advantages in understanding Colletotrichum diseases of some tropical perennial crops. En *Colletotrichum:biology , pathology and control*. Bailey, J. YJeger, M. Eds. CAB International.
- Wendy Coss. 2018. La soya, oleaginosa de importancia mundial. 2000 Agro. *Revista industrial del campo*, 1, 1.