



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Tlajomulco



TESIS

CON EL TEMA:

“Evaluación de métodos de conservación e inoculación de roya (Thekospora minima) en plantas de arándano en vitro y ex vitro”

QUE PRESENTAN:

**MITZY VANELLY ESPINOZA ROBLES
MEIRE SOUZA PEREIRA**

ASESOR:

DRA. MAYRA ITZCALOTZIN MONTERO CORTES

REVISORES:

**DR. ARTURO MOISES CHAVEZ RODRIGUEZ
DR. JOAQUIN ALEJANDRO QUI ZAPATA**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
INGENIERAS EN AGRONOMIA**

TLAJOMULCO DE ZÚÑIGA, JALISCO. MARZO, 2023.



Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco, **21/febrero/2023**

No. DE OFICIO: D.SA/350/2023
ASUNTO: Autorización de impresión
definitiva y digitalización

C. MITZY VANELLY ESPINOZA ROBLES
C. MEIRE SOUZA PEREIRA
PASANTES DE LA CARRERA DE INGENIERÍA EN AGRONOMÍA
P R E S E N T E

Dado que el Comité dictaminó como **APROBADA** su TITULACIÓN INTEGRAL OPCIÓN I (TESIS), con el tema **“Evaluación de métodos de conservación e inoculación de roya (Thekospora minima) en plantas de arándano en vitro y ex vitro”** y determinó que dan cumplimiento con los requisitos establecidos, se les notifica que tienen la autorización para su impresión definitiva y digitalización.

Sin otro particular quedo de usted.

ATENTAMENTE

*Excelencia en Educación Tecnológica®
Educando por la Sociedad Actual y los Retos del Futuro*

C. MARÍA ISABEL BECERRA RODRÍGUEZ
DIRECTORA DEL PLANTEL



C.c.p.- Coordinación de Apoyo a la Titulación. - Edificio
C.c.p.- Minutario. -

MIBR/AIBR/ALGC/mjhc





Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco, **20/FEBRERO/2023**

No. DE OFICIO: D.SA/DCA/083/2023
ASUNTO: Liberación de proyecto para
la titulación integral.

ICE. ANA LUISA GARCIA CORRALEJO
JEFA DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES
P R E S E N T E

Por este medio informo que ha sido liberado el siguiente proyecto para la titulación integral:

NOMBRE DEL ESTUDIANTE Y/O EGRESADO:	MITZY VANELLY ESPINOZA ROBLES
NO. DE CONTROL:	18940105
PRODUCTO:	OPCIÓN I (TESIS)
CARRERA:	INGENIERÍA EN AGRONOMIA
NOMBRE DEL PROYECTO:	"Evaluación de métodos de conservación e inoculación de roya (Thekospora minima) en plantas de arándano in vitro y ex vitro"

Agradezco de antemano su valioso apoyo en esta importante actividad para la formación profesional de nuestros egresados.

ATENTAMENTE

Excelencia en Educación Tecnológica®
Educando para la Sociedad Actual y los Retos del Futuro



S.E.P.
TECNM
14DIT0003B
IT TLAJOMULCO
DEPARTAMENTO
CIENCIAS
AGROPECUARIAS

Miguel Hernandez Flores
ING. MIGUEL HERNANDEZ FLORES
RESPONSABLE DEL DEPARTAMENTO
DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

<i>Mayra I Montero Cortés</i> DRA. MAYRA ITZCALOTZIN MONTERO CORTES Nombre y firma del asesor	<i>Arturo Moises Chavez Rodriguez</i> DR. ARTURO MOISES CHAVEZ RODRIGUEZ Nombre y firma del revisor	<i>Joaquin Alejandro Qui Zapata</i> DR. JOAQUIN ALEJANDRO QUI ZAPATA Nombre y firma del revisor
--	--	--

C.c.p.- Expediente.
MHF/mjhc*





Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco, **20/FEBRERO/2023**

No. DE OFICIO: D.SA/DCA/084/2023
ASUNTO: Liberación de proyecto para
la titulación integral.

ICE. ANA LUISA GARCIA CORRALEJO
JEFA DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES
P R E S E N T E

Por este medio informo que ha sido liberado el siguiente proyecto para la titulación integral:

NOMBRE DEL ESTUDIANTE Y/O EGRESADO:	MEIRE SOUZA PEREIRA
NO. DE CONTROL:	E20940148
PRODUCTO:	OPCIÓN I (TESIS)
CARRERA:	INGENIERÍA EN AGRONOMÍA
NOMBRE DEL PROYECTO:	"Evaluación de métodos de conservación e inoculación de roya (Thekospora minima) en plantas de arándano en vitro y ex vitro"

Agradezco de antemano su valioso apoyo en esta importante actividad para la formación profesional de nuestros egresados.

ATENTAMENTE

Excelencia en Educación Tecnológica®
Educando para la Sociedad Actual y los Retos del Futuro



S.E.P.
TECNM
14DIT0003B
IT TLAJOMULCO
DEPARTAMENTO
CIENCIAS
AGROPECUARIAS


ING. MIGUEL HERNANDEZ FLORES
RESPONSABLE DEL DEPARTAMENTO
DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

 DRA. MAYRA ITZCALOTZIN MONTERO CORTES Nombre y firma del asesor	 DR. ARTURO MOISES CHAVEZ RODRIGUEZ Nombre y firma del revisor	 DR. JOAQUIN ALEJANDRO QUI ZAPATA Nombre y firma del revisor
--	--	--

C.c.p.- Expediente.
MHF/mjhc*



AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios, sus ángeles y al destino que me dio la gracias de estar terminando un ciclo muy importante de mi vida, donde he realizado muchos cambios personales y profesionales, que me hicieron llegar hasta aquí y a concluir mi objetivo.

Agradezco a mi mamá, que de lejos siempre me dio fuerzas para seguir adelante, a mi primogénito que tuvimos que estar distantes y al mismo tiempo muy cercanos en sentimientos, amor cariño y respeto.

Agradezco a mi esposo que me apoyó en cada etapa y obstáculos que se fueron desarrollando, pero superados.

Agradezco mucho a México y a la Institución de Ensino: Instituto Tecnológico Nacional de México “campus” Tlajomulco, dentro de los cuales me han aceptado de brazos abiertos y me direccionaron a concluir con éxito mi profesionalización.

Muchas Gracias!

Meire Souza Pereira

AGRADECIMIENTOS

Mis agradecimientos están dedicados primeramente a mi asesor interno la Dra. Mayra Itzcalotzin Montero Cortés que sin su ayuda y conocimientos no hubiese sido posible este proyecto. A mí compañero de proyecto Inocente Olmos por compartir sus conocimientos conmigo.

Al instituto tecnológico de Tlajomulco, por haberme permitido realizar mis residencias profesionales en la institución, en el laboratorio de biotecnología Vegetal, por todas las herramientas y recursos que me brindaron.

A mis padres por su apoyo incondicional, para lograr mi sueño y por enseñarme que con esfuerzo y trabajo todo se consigue.

Finalmente a mis compañeros de clases que me brindaron su apoyo cuando lo necesité, en especial a mi primo Galo Alberto y a mi tía María de Jesús que siempre estuvieron para mí brindando su apoyo y dando alientos para llegar hasta el final.

A mí esposo e hija por ser pacientes en la espera de tiempo hacía ellos y por apoyarme en mi sueño.

¡INFINITAS GRACIAS A TODOS!.

Mitzy Vanelly Espinoza Robles

RESUMEN

La roya es una enfermedad causada por el hongo *Thekopsora mínima*, específicamente patógeno de arándanos y de su familia ericaceae, la enfermedad causa impacto económico en la cadena de producción y exportación del cultivo en México. País que ha desarrollado gran potencial productivo con grados de tecnificación y mano de obra, que se destaca por su exportador cercano Estados Unidos. Los primeros casos de roya en México ocurrió en 2007, una enfermedad cuarentenaria que hasta la fecha sigue siendo objeto de estudio y desarrollo, principalmente por las características intrínsecas del hongo patógeno, que es un parásito obligado, que necesita de su huésped para alimentarse y reproducirse, un desafío para los seguimientos de la roya, que sin su hospedero y condiciones climáticas favorables es inviable su reproducción y conservación, con esto el proyecto tiene el objetivo de evaluar la viabilidad de hojas de arándano en cámara húmeda, así como incrementar el periodo de viabilidad para la conservación de la roya por medio de liofilización con ayuda de lioprotectores y crioprotectores como: trehalosa, glicerol y leche descremada, agentes de comprobada eficacia como protectores del proceso de liofilización, esto con la finalidad de obtener durante todo el año inóculo viable para generar estrategias efectivas para el control de la roya del arándano.

Se establecieron diferentes métodos para buscar conservar lo mejor posible la integridad de la hoja de arándano *in vitro*, por lo que evaluó la viabilidad de la hoja de arándano sin ser infectada por roya (*Thekopsora mínima*), debido a que la hoja es la principal área contaminada por el agente causal. Se realizaron pruebas de liofilización con diferentes crioprotectores los cuales fueron: leche descremada, glicerol y trehalosa para evaluar sus aspectos físicos y determinar cuál es la mejor opción a utilizar para la liofilización de roya. Por otro lado, se desarrollaron estrategias para determinar la viabilidad de la roya (con cloruro de tetrazolio), y la inoculación de roya en hojas y plantas de arándano.

En cuanto al proceso de liofilización la evaluación de características físicas de las soluciones con lioprotectores y crioprotectores liofilizadas, los mejores tratamientos fueron la Leche al 10%, la Trehalosa al 10%, el Glicerol al 10%, la Leche al 10% con Trehalosa al 1% y la Leche al 10% con Glicerol al 1%, además de presentar una buena disolución de la pastilla en presencia del disolvente (agua estéril). En cuanto a la viabilidad de la roya el método por TTC puede ser una alternativa para poder determinar la viabilidad de las uridenosporas en las diferentes etapas de la liofilización.

En el experimento de la inoculación de roya en hojas de arándano en cámara húmeda, se determinaron las condiciones para mantener el mayor tiempo posible la integridad de la hoja, siendo el tratamiento con las hojas en cajas petri, almacenadas en un recipiente hermético con humedad. En cuanto a la inoculación de roya en plantas de arándano *in vitro* se presentó contaminación en todos los tratamientos, lo que es indicativo que hay que mejorar el manejo en campana de flujo laminar para evitar la contaminación.

En el presente trabajo se logró establecer las soluciones para efectuar el proceso de liofilización de la roya y se desarrolló una estrategia para determinar la viabilidad de las uridenosporas. Sin embargo, falta optimizar las condiciones para que las hojas de arándano puedan durar mayor tiempo en la cámara húmeda, así como optimizar el proceso de la inoculación de roya en plantas de arándano *in vitro*.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	2-3
RESUMEN	4-5
1. INTRODUCCIÓN	8-10
2. MARCO TEORICO	11
2.1 Clasificación taxonómica del <i>Vaccinium corymbosum</i> L	11
2.2 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA	12
2.3 IMPORTANCIA ECONÓMICA DEL CULTIVO DE ARÁNDANO EN MÉXICO	13-16
2.4 PRINCIPALES ENFERMEDADES DEL ARÁNDANO	17
2.5 Botrytis cinerea	17
2.6 Pudrición radicular: <i>Phytophthora cinnamomi</i> sp	18-19
2.7 Alternaria sp	19-20
2.8 Verticilosis (<i>Verticillium dahliae</i>)	20
3. LA ROYA	21-22
4. CARACTERÍSTICAS DEL HONGO DE LA ROYA Y SUS DESAFÍOS	23
4.1 Clasificación taxonómica del <i>Thekopsora minima</i>	23-25
5. PROBLEMAS A RESOLVER	26-27
6. JUSTIFICACION	28
7. OBJETIVOS	29
7.1 OBJETIVO GENERAL	29
7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
8. DESARROLLO	30

8.1 DESARROLLO DE LAS ACTIVIDADES	30
8.1.1 Establecimiento de tratamientos para evaluar la viabilidad de la hoja de arándano sin ser infectada de roya (<i>Thekopsora mínima</i>).	30-31
8.1.2 Pruebas de liofilización de crioprotectores	32-33
8.1.3 Inoculación de roya en hojas de arándano	33
8.1.4 Inoculación de roya en plantas in vitro de arándano	34
8.1.5 Liofilización de roya en crioprotectores	34-35
8.1.6 Determinación de células viables	36-37
9. RESULTADOS	38
9.1 Evaluaciones (Establecimiento de tratamientos para evaluar la viabilidad de la hoja de arándano sin ser infectada de roya (<i>Thekopsora mínima</i>).	38-41
9.2 Evaluaciones (Pruebas de liofilización de crioprotectores.)	42-43
9.3 Evaluación de soluciones liofilizadas	44-45
9.4 Evaluación (Disolución de crioprotectores)	46-47
9.5 Evaluaciones (Inoculación de roya en hojas de arándano)	47-48
9.6 Evaluaciones (Inoculación de roya en plantas in vitro de arándano)	49-50
10. CONCLUSIONES	51-53
11. FUENTES DE INFORMACIÓN	54
11.1 BIBLIOGRAFÍA	54-60

1. INTRODUCCIÓN

El arándano (*Vaccinium spp*) es un arbusto de la familia de las ericáceas del género *Vaccinium*. Sus frutos son bayas de color oscuro, azuladas o rojizas de más o menos 6 mm de diámetro, planta de carácter arbustivo. Presenta cualidades nutricionales y antioxidantes que lo hace un fruto de alto valor medicinal y nutricional. (Jiménez & Abdelnour 2013). Estas frutas son originarias de Europa, Asia y América, se pueden ver en estado silvestre en márgenes de caminos o torrenteras. Crecen en terrenos húmedos y se pueden encontrar a 1.500 metros de altitud. El blueberry (*Vaccinium corymbosum L.*) es hoy uno de los frutales comerciales más domesticados (SCCH, 2021).

Los primeros intentos de selección desde el medio silvestre a través de accesiones promisorias las realizó Frederick Coville a partir de 1911, las cuales mejoró notablemente a través de cruzamiento de aquellas accesiones y posterior selección de las progenies obtenidas. Coville comenzó este trabajo pionero en el Departamento de Agricultura de EE.UU.-USDA (Undurraga & Vargas 2013)

La principal propiedad de estos frutos son sus altos contenidos de antocianinas y vitaminas, que intervienen en la formación de colágeno, huesos, dientes, glóbulos rojos y favorecen la absorción del hierro de los alimentos y la resistencia a las infecciones (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2017)

El arándano es uno de los alimentos con mayor cantidad de antioxidantes como ya se mencionó anteriormente y además aporta vitamina C, potasio y fibra, asimismo, el consumo de este fruto fortalece el sistema inmunitario. Lo cual ha sido un factor para el rápido crecimiento de su producción y comercialización a nivel mundial (Defilippi, B et al, 2013).

El principal mercado consumidor de la frutilla es Estados Unidos de América acompañados de Canadá, Inglaterra, Holanda y Alemania, mismo que EEUU presenta una gran producción propia e importa desde México, Chile y Argentina, en

los meses de septiembre hasta abril, debido a la estacionalidad de la fruta en la zona (Medina Gutiérrez & Sánchez Sánchez 2014).

La industria mexicana de berries espera un crecimiento de entre 8 y 10% en 2022, según un estudio de Agroberichten Buitenland. México ha logrado distinguirse por ser el primero en 'tropicalizar' la fruta, marcándose a sí mismo como un proveedor de arándanos frescos de invierno y primavera. Si bien sus cosechas máximas ocurren entre febrero y abril, en México la temporada generalmente se extiende de septiembre a junio. El país cuenta con un alto grado de conocimiento de los productores en términos de genética y técnicas de cultivo. (IBO, 2022)

En México, Jalisco es la entidad especializada en producción de arándanos azules, pues además de que goza de las condiciones edafológicas y climáticas, también cuenta con toda la tecnología y recursos humanos de calidad para producirlos en México, generando 36,700 toneladas de arándano azul al año, en los estados de Jalisco, Michoacán y Sinaloa, principalmente. (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2018)

En el otoño de 2007 la Roya se ha convertido en una de las enfermedades más importantes del arándano en estos estados de Jalisco y Michoacán; los síntomas en las superficies de las hojas aparecen como pequeñas manchas amarillas que luego se vuelven necróticas a medida que crecen y se unen, eventualmente cubren grandes áreas de hojas individuales. En el envés de las hojas, pequeñas motas rodeadas de pequeñas gotas empapadas de agua, aparecen halos, que se vuelven amarillos y producen un polvo amarillento, que son uredinios con uredosporas. (Rebollar-Alviter et al., 2011)

La roya del arándano es una enfermedad fúngica importante que afecta a los arándanos. La roya del arándano puede causar defoliación y ocasionalmente la muerte de la planta con severas infecciones. La enfermedad se transmite fácilmente a través de esporas transportadas por el viento de plantas infectadas, o directamente por las personas, a través de ropa o equipos contaminados. Un parásito obligado que se alimenta de los nutrientes disponibles en las hojas de

arándano, causando daños económicos en la cadena de comercialización.
(Department of Primary Industries and Regional Development, 2022; Duplessis et al
2011)

2. MARCO TEÓRICO

El arándano es un fruto arbusto nativo de Norteamérica, pertenece al grupo de las berries y está clasificado en la familia Ericaceae, género *Corymbosum*. La planta es erecta. Las hojas son alternas, cortamente pediceladas, enteras o aserradas. Sus flores pueden ser axilares o terminales, en racimo. El fruto es una falsa baya esférica, por provenir de una flor epígina; de color azul metálico, con 8 - 18 semillas blandas y pequeñas (SUDZUKI, 2002).

6.1 Clasificación taxonómica del *Vaccinium corymbosum* L

Phyllum: Plantae

Sub Phyllum: Magnoliophyta

Clase: Magnoliophytina

Subclase: Magnoliopsida

Orden: Ericales

Familia: Ericaceae

Subfamilia: Vaccinioideae

Género: *Vaccinium*

Especie: *Vaccinium corymbosum* L

2.2 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Raíces: Las raíces de los arándanos tienen un aspecto fibroso y se distribuyen superficialmente, lo que las vuelve dependientes de una provisión constante de humedad y de la necesidad de contar con una capa superficial de suelo suelto y bien aireado que permita el desarrollo de una abundante cabellera. En condiciones naturales las raíces están asociadas a micorrizas específicas, con las cuales mantienen una relación de mutuo beneficio (simbiosis). (Münzenmayer, 2015)

Tallo: Nacen de la base de la planta. Son de color marrón anaranjado (según a la variedad) y llevan las yemas vegetativas y florales. Su grosor depende de la edad de la planta y de su ubicación dentro de ella. La ramificación es abundante.

Hojas: Son alternas con pecíolos cortos. Las especies domésticas poseen hojas caedizas. Durante el otoño las variedades ojo de conejo y alto, desarrollan una coloración rojiza.

Flores: Poseen corola blanca o rosada. Se disponen en racimos generalmente axilares, las flores se diferencian en las yemas terminales de las ramillas cuando se detiene el crecimiento vegetativo al inicio del otoño y probablemente en respuesta al fotoperiodo.

Fruto: El fruto es una baya casi esférica, que dependiendo de la especie y cultivar, puede variar en tamaño de 0,7 a 1,5 centímetros de diámetro, y en color desde azul claro hasta negro. La epidermis del fruto está cubierta por secreciones cerosas, que le dan una terminación muy atractiva, y que tiene importancia a la hora de su comercialización. Tiene un sabor particular, difícilmente comparable: dulce y ligeramente ácido a la vez. (Gordó, 2008)

2.3 IMPORTANCIA ECONÓMICA DEL CULTIVO DE ARÁNDANO EN MÉXICO

El desarrollo de los arándanos cultivados comenzó a principios del siglo XX gracias a la colaboración de Elizabeth White y el botánico del USDA, Frederick Coville en la década de 1890. (SCCH, 2021)

El primer híbrido de arándano fue obtenido en 1908 por Frederick Coville a través de cruzamientos y posterior selección de las progenies obtenidas. Posterior al trabajo de Coville se agregaron varias universidades de los EE. UU. y oficinas de la USDA en diferentes estados formando una red que contribuyó a extender el cultivo comercial de arándanos y su adaptación a diferentes ambientes (suelo y clima), ayudando a mejorar la productividad y calidad del cultivo (USHBC, 2020).

Desde entonces, la producción comercial de arándanos se ha expandido en los Estados Unidos y en todos los continentes, excepto en la Antártida. Gracias a los avances en la genética y las prácticas de producción, los arándanos se cultivarán en al menos 30 países en 2019 y en una variedad de climas. Las principales clases de plantas de arándanos que actualmente se cultivan comercialmente son highbush, lowbush (a veces denominadas silvestres), half-high (un cruce entre las especies de highbush and lowbush), Rabbiteye y Southern highbush. La producción de plantas puede ser de corta o larga duración, con algunas plantas de cultivo productivas desde 1-5 años o hasta 40-60 años (Torres, 2015).

Hoy día el cultivo de arándano se encuentra extendido en países como China, Japón, Chile, Nueva Zelanda, Argentina y México. A nivel mundial la superficie ha aumentado en producción con 1,514,231 toneladas, obtenidas en una superficie cosechada de 168,890 hectáreas, por lo que el rendimiento promedio quedó en 9.0 toneladas por hectárea, según la información presentada en FAOSTAT para el año 2020. Este crecimiento se ha observado en México, impulsado principalmente por las bondades de estar cerca del mercado de Estados Unidos y por la diversidad climática, pues tan solo en el año 2015 se reportó una producción de 15,489

toneladas con un valor de exportación de 121 millones de dólares, las condiciones climáticas y la cercanía con el mercado demandante hacen del arándano un cultivo altamente rentable en México. (INTAGRI. 2017)

En México, Jalisco es la entidad especializada en producción de arándanos azules, pues además de que goza de las condiciones edafológicas y climáticas, también cuenta con toda la tecnología y recursos humanos de calidad para producirlos, pues las berries, en general, requieren de un tratamiento profesional y especializado para su comercialización. México produce 36,700 toneladas de arándanos azules al año, en los estados de Jalisco, Michoacán y Sinaloa, principalmente. (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2018)

Económica y comercialmente, el arándano ha tomado cierta importancia en México en los últimos años, además de que su cultivo requiere de inversiones considerables de capital. Aunque el cultivo no deja de tener una importancia marginal en la agricultura nacional, en la última década han empezado a sobresalir, de tal manera que la superficie dedicada a la especie se ha incrementado de manera considerable. (González, 2019)

Tabla 1. Principales regiones productoras en América.

	Fresh	Process	Total	Fresh	Process	Total	Fresh	Process	Total
NORTEAMERICA	275.4	176.4	451.8	298.7	211.7	510.4	429.9	204.4	634.2
E.E.U.U / Canadá	174.2	145.5	319.6	157.6	173.5	331.1	171.4	150.1	321.5
México y Centroamérica	10.5	0.1	10.6	16.7	0.6	17.3	48.2	0.7	48.9
Sudamérica	90.7	30.9	121.6	124.5	37.6	162.1	210.2	53.6	263.8

(Orozco, 2021)

La defensa de las tecnologías de protección por parte del gobierno mexicano son los principales factores que impulsan el desarrollo de la industria mexicana del arándano. Las tecnologías de túneles altos y casas de sombra son las tecnologías de protección más destacadas que se utilizan en México, con esto los productores pueden prolongar la temporada de cultivo y producir arándanos de alta calidad. El segundo factor son los altos rendimientos monetarios de este cultivo, lo que es atractivo para el cambio de cultivos, así también México tiende a enviar arándanos durante los períodos en que sus exportaciones incurren en precios altos, adjunto la mano de obra son bajos, de modo que la ventaja competitiva en costos de producción y mano de obra ofrece un futuro prometedor para la industria. (IBO, 2022)

Los manejos que garantizan la producción de arándanos masiva por medio de las tecnologías de producción del arándano, encontramos la propagación sexual y asexual, siendo la forma asexual la más utilizada para el establecimiento de cultivos, como es la propagación por esquejes o clonal, también por micropropagación *in vitro*, que además de garantizar plantas en cantidad para el establecimiento en larga escala, esta es libres de patógenos como virus y bacterias. (Cazar, 2021)

La propagación sexual, por semillas, son recolectadas cuando presentan la maduración fisiológica de la fruta, principalmente en campo, el método es empleado para el mejoramiento genético de las variedades, dando seguimiento a los estudios y generación de nuevas variedades (Undurraga et al ,2013).

La propagación vegetativa de arándano se ha realizado preferentemente de dos maneras, el enraizamiento de esquejes de tallo y la micropropagación.

Para obtener el material para esquejes se utilizan los tallos o ramillas con madera del año, lo cual se realiza en dos épocas, durante julio a agosto que corresponde a un esqueje semileñoso sin hojas y durante enero a febrero con esqueje de madera suave con hojas. El tratamiento de los esquejes de arándanos consiste en desinfección, corte y aplicación de hormonas enraizantes. (Angulo et al., 2015)

Para la micropropagación la mayoría de los estudiosos recomiendan para el cultivo *in vitro* el uso del medio WPM con diferentes variantes y gelificado con agar, la elección apropiada de citoquinina determina la micropropagación exitosa del arándano (Georgieva & Kondakova, 2021)

Para Ruzicet y colaboradores (2012), los medios nutritivos tienen un impacto crítico en la multiplicación y el crecimiento de los arándanos, el medio MS no se puede utilizar para la micropropagación de arándanos debido a la baja multiplicación y alta incidencia de necrosis de brotes ya con una baja concentración de IBA (≤ 1 mg/L) añadida en el medio HAN suplementado con zeatina aumenta la eficiencia de multiplicación de brotes de arándanos *in vitro* así se puede recomendar para la propagación a gran escala de alta calidad de plantas.

2.4 PRINCIPALES ENFERMEDADES DEL ARÁNDANO

El arándano es una especie vigorosa, de rápido crecimiento y altos rendimientos, pero susceptible a varias enfermedades que pueden alterar su desarrollo, acortar su vida productiva y afectar la calidad y cantidad de fruta. La alta densidad de plantas que poseen los huertos y los altos niveles de nutrientes que se utilizan para mantener máximos niveles productivos, facilita el establecimiento y diseminación de enfermedades. (Undurraga et al 2013)

2.5 *Botrytis cinerea*

Los síntomas de la enfermedad del tizón (*Botrytis cinerea*) aparecen en el campo cuando la floración de los primeros clones comienza a envejecer. Las flores infectadas se vuelven marrones, pero permanecen unidas al tallo. Las hojas, la fruta inmadura e incluso los tallos pueden morir. (New Nouveau Brunswick, 2010)

Una vez que el hongo se establece en los clones de floración temprana, el tejido infectado puede servir como fuente de esporas para infectar los clones de floración tardía. Los productores deben monitorear tanto las malezas, especialmente la acedera de oveja, como los clones de arándanos que florecen temprano para detectar infecciones por *Botrytis*. (University of Maine, 2007)

Las infecciones de fruta pueden ser tan temprano como en cuaja y manifestarse cuando alcanza la madurez o en destino, sobre todo si existen condiciones propicias para su desarrollo en la poscosecha, como son los quiebres de la cadena de frío. (Undurraga et al 2013).



Figura 1. Sintomatología de *Botrytis cinerea* en fruto de arándano (France,2019.)

2.6 Pudrición radicular: *Phytophthora cinnamomi* sp

Phytophthora cinnamomi es uno de los patógenos de plantas más devastadores del mundo. Infecta a cerca de 5000 especies de plantas, incluidas muchas de importancia en la agricultura, la silvicultura y la horticultura. (Hardham y Blackman, 2017). La enfermedad puede comenzar desde el vivero, donde se produce muerte de brotes, necrosis de la base de la estaca y falta de desarrollo radical. En los huertos los síntomas son clorosis y necrosis del borde de las hojas, follaje rojizo, defoliación, menor crecimiento y falta de vigor. El sistema radical muestra necrosis parciales o extensivas de raíces secundarias, y que pueden progresar hasta dejarlas completamente negras, la corteza de la raíz se desprende con facilidad, exhibiendo un centro de tonalidades café oscuro. (Undurraga et al 2013)

En campo se puede observar cómo el ataque de la *Phytophthora* en las raíces y los tallos de las plantas susceptibles hacen que se pudran. Las plantas ya no pueden absorber suficiente agua y nutrientes y mueren. Los primeros síntomas visuales de infección son la decoloración (generalmente amarilla o roja) de las hojas, seguida de la muerte regresiva de toda la planta. (Department for Environment and Heritage, 2009)



Figura 2. Plantas de arándanos con síntomas de amarillamiento y enrojecimiento foliar. (France,2019.)



Figura 3. Planta de arándanos con síntomas avanzados de pudrición de raíz y cuello. (France,2019.)

2.7 *Alternaria* sp

El hongo *Alternaria* spp. es el agente causal de la mancha foliar por *Alternaria* y la pudrición de la fruta en arándanos. La mancha foliar por *Alternaria* se ha reportado como pudrición de la fruta en casi todas las regiones de cultivo de arándanos en todo el mundo. (Miles, 2020)

La pudrición de frutos causada por *Alternaria* spp. es uno de los factores más importantes que afectan la calidad poscosecha y la vida útil de la fruta de arándano. (Zhuy Xiao 2015). Como resultado lesiones hundidas en las bayas. Más tarde, se puede ver una masa verde grisácea de micelio fúngico y esporas de color verde oscuro en la superficie de la baya; las lesiones también pueden desarrollarse en las hojas como puntos necróticos pequeños (de un cuarto de pulgada de diámetro), generalmente redondos, con un borde de color marrón rojizo. (Anco & Ellis, 2011)



Figura 4. Manchas foliares causadas por *Alternaria* sp. (France,2019.)



Figura 5. Esporulaci3n del hongo en frutos de ar3ndanos (France,2019.)

2.8 Verticilosis (*Verticillium dahliae*)

El marchitamiento por *Verticillium* es una enfermedad grave de muchos cultivos agr3colas y hort3colas econ3micamente importantes. La enfermedad afecta a las plantas herb3ceas anuales y perennes, as3 como a los 3rboles y arbustos le3osos, reduciendo el rendimiento de los cultivos agr3colas, as3 como la vida 3til de las plantas, generando mayores insumos, mayores costos de producci3n y p3rdidas econ3micas. (Dung, 2021)

La Verticilosis causa marchitez y clorosis moderada del follaje, seguido de un r3pido desecamiento del borde de las hojas, similar a la falta de agua. Esta marchitez o necrosis de hojas puede ser parcial de las ramas o dentro del arbusto. La mayor intensidad de s3ntomas se produce en verano y se caracteriza por obstruir el sistema vascular (xilema) impidiendo el paso de agua. Al cortar los tallos afectados se observan anillos necr3ticos que pueden ser parciales o completos. (INTAGRI, 2019)



Figura 6. Sintomatolog3a de verticilosis en hoja y tallos de ar3ndanos.(France,2019.)

3. LA ROYA (*Thekopsora mínima*)

Los síntomas iniciales de la roya del arándano son manchas rojizas en la superficie superior de las hojas jóvenes, causada por el hongo *Thekopsora mínima*. Las lesiones se oscurecen con la edad, a menudo rodeados por un halo amarillo, y pueden fusionarse a medida que avanza la enfermedad. En el envés de las hojas se desarrollan pústulas amarillas que liberan esporas capaces de infectar otras hojas y propagando la enfermedad, que pueden escalar a fruto y tallos. (PIRSA, 2019)

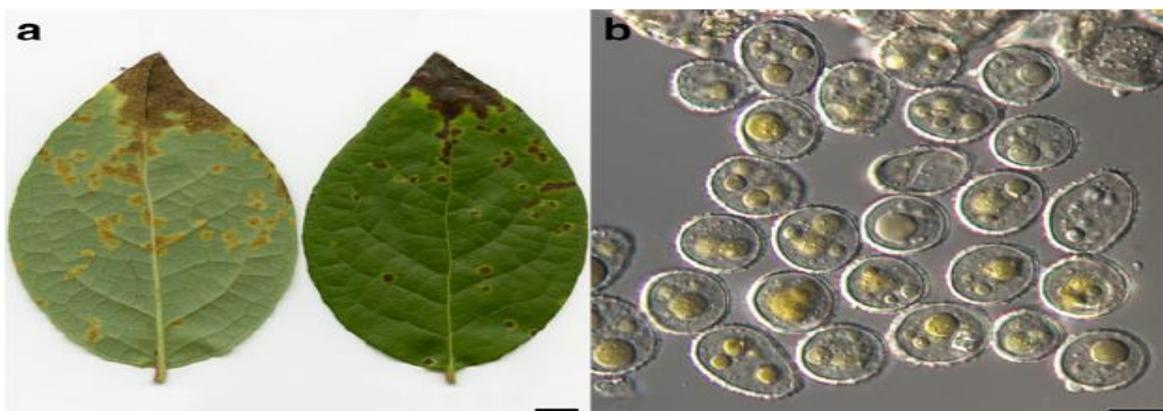


Figura7. *Thekopsora minima* en *Vaccinium corymbosum*. A.Síntomas foliares abaxiales y adaxiales; B. Uredosporas. Escala A=1 cm; B=10 μ m. (France,2019.)

La roya del arándano puede causar defoliación y ocasionalmente la muerte de la planta con severas infecciones. Se desarrollan pequeñas manchas amarillas en la parte superior de las hojas. A medida que avanza la infección las manchas crecen y se oscurecen a un color marrón, a menudo rodeado por un halo amarillo. La enfermedad se transmite fácilmente a través de esporas transportadas por el viento de plantas infectadas, o directamente por las personas a través de ropa o equipos contaminados. (Department of Primary Industries and Regional Development, 2022).

En la parte inferior de las hojas, aparecen pequeñas motas rodeadas de pequeños halos empapados de agua, se vuelven amarillas y producen soros pulverulentos que son uredinios con uredosporas. Los uredinios son hipófilos, dispersos agregarios y

a veces superficialmente parecen confluentes, de hasta aproximadamente 300 μm de diámetro, en forma de cúpula y peridio hemisférico en la sección transversal, anaranjados, volviéndose pulverulentos, sin células ostiolares claramente agrandadas y bien diferenciadas. Las uredosporas son subglobosas, obovadas, oblongas o elipsoides, de 17,6 a 27,2 \times 12,8 a 17,6 μm , con paredes equinuladas hialinas de 1,2 a 1,8 μm de espesor y con contenidos de amarillo a hialino, siendo identificada como *Thekopsora minima*. (Rebollar-Alviter et al., 2011)

El hongo que crece en la hoja depende de las condiciones ambientales, las pústulas pueden desarrollarse a partir de los 10 días después de la infección; las esporas luego son movidos por el aire o la humedad para infectar nuevos tejidos El número de esporas puede acumularse rápidamente y puede haber muchos ciclos de infección a lo largo una temporada. Las esporas sobreviven al menos de 4 a 8 semanas en hojas en el suelo del huerto, aunque la viabilidad disminuye con el tiempo; además de las hojas las lesiones y pústulas también se puede formar en la fruta, reduciendo la baya su calidad y comerciabilidad. (Craig, 2021)



Figura 8. Esporas *Thekopsora minima* en la fruta de arándano. (France, 2019.)

4. CARACTERÍSTICAS DEL HONGO DE LA ROYA Y SUS DESAFÍOS

4.1 Clasificación taxonómica del *Thekopsora minima*

Reino: Fungi

Filo: Basidiomycota

Clase: Pucciniomycetes

Orden: Pucciniales

Familia: Pucciniastraceae

Género: *Thekopsora Magnus*

Especie: *Thekopsora minima* (Arthur) P.Syd. & Syd.

Basónimo: *Pucciniastrum minimum* Arthur.

El hongo de la roya es del orden taxonómico Pucciniales estos organismos necesitan de un huésped para vivir y reproducirse. Las plantas huésped pueden ser varios tipos de plantas, desde helechos, coníferas, plantas con flores, arbustos, pastos y árboles caducifolios. Algunas especies requieren una especie específica como planta huésped, el caso de la *Thekopsora mínima*, parásito obligado del arándano y su familia Ericaceae. En condiciones de ausencia de las plantas hospedantes requeridas, los hongos en este orden pueden permanecer latentes en su forma de esporas hasta que se encuentre la planta hospedante adecuada. (Ford, 2022)

Keith et al. (2008) ha descrito que los síntomas en hojas comienzan con manchas cloróticas de aproximadamente 1 mm que se expanden y desarrollan dentro anillos necróticos de color marrón rojizo con un halo clorótico. Las nuevas lesiones y uredosporas se mantienen apareciendo por un tiempo de 4 meses. La defoliación se produce sobre plantas donde la infección es severa.

Los hongos de la roya son biotrofos obligados, que extraen nutrientes sólo de tejidos vegetales vivos y no pueden crecer separados de sus anfitriones. (Duplessis et al 2011)

Como biotrofos obligados, los hongos de la roya solo pueden alimentarse, crecer y reproducirse en sus huéspedes vivos y desarrollan estructuras de infección específicas llamadas haustorios que son necesarias para establecer interacciones cercanas dentro de los tejidos del huésped infectado. (Lorrain,2019)

Los hongos de la roya dependen completamente de los nutrientes proporcionados por las plantas hospedantes vivas para reproducirse y completar sus ciclos de vida (Staples, 2000), lo que es un gran desafío para su estudio, que invisibiliza el empleo de medios de cultivos, que podrían ser usados para su conservación y reproducción sistemática en laboratorio.

Mismo con las dificultades presentes los estudios son direccionados para una posible conservación y reproducción de la roya en ambiente controlado (Lorrain,2019). Dentro de los posibles medios de conservación disponibles tenemos la liofilización. La liofilización se define como un proceso estabilizante en el que primero se congela una sustancia y luego la cantidad de solvente (por ejemplo, agua) se reduce primero por sublimación (secado primario) y luego por desorción (secado secundario) a valores que ya no admitirán crecimiento biológico o reacciones químicas.

Las ventajas de los microorganismos liofilizados son la viabilidad celular estabilizada y también la facilidad de manipulación para el envío y almacenamiento, para la industria de la microbiología, la liofilización permite que las células microbianas conservarse durante décadas sin pérdida de viabilidad y riesgo de mutación asociado con el almacenamiento congelado o activamente células en crecimiento. (Morgan & Vesey,2009).

La liofilización está considerada como el método más adecuado para la preservación de microorganismos. La técnica involucra el congelamiento de un

cultivo seguido por un secado a bajo vacío, lo cual resulta en la sublimación de agua de la suspensión celular. El agente protector empleado en la liofilización es un factor importante en el proceso. (Frías et al., 2014)

Los agentes protectores se denominan como crioprotectores permeables, que son sustancias de bajo peso molecular que pueden pasar a través de la membrana celular, reemplazando el volumen de agua intracelular evitando los daños producidos por la formación de cristales de hielo y, a su vez, manteniendo el volumen celular impidiendo el colapso celular por excesiva deshidratación (Medeiros et al., 2002).

Las sustancias crioprotectoras, como la trehalosa, glicerol y sacarosa, por ejemplo, protegen a las células tanto procariontes como eucariontes y aumentan el porcentaje de viabilidad después el tratamiento térmico por lo que se utilizan principalmente en la industria farmacéutica y de alimentos. (Doria & Chavailli, 2010)

Entre los agentes recomendados están la leche descremada en concentraciones del 10% al 20%, ya que evita la lesión celular mediante la estabilización de los constituyentes de la membrana celular y crea una estructura porosa en el producto liofilizado que hace más fácil la rehidratación, además de contener proteínas que proporcionan una capa protectora para las células. (Frías et al., 2014)

5. PROBLEMAS A RESOLVER

El hongo de la roya (*Thekopsora minima*) es un patógeno ya presente en el campo mexicano de producción de arándanos, una enfermedad con poco tiempo de diseminación en este país, que viene causando impactos económicos en la producción y comercialización de la blueberry.

El arándano es una producción agrícola comercial que ganó espacio en su explotación, debido a su mercado de exportación principal estar cercano al territorio nacional y también por ser una fruta rica en vitaminas, antioxidantes y acción anticancerígena ya comprobada, pero el cultivo viene sufriendo con la amenaza de la roya.

La roya del arándano es un hongo parásito obligado, es decir que no se reproduce y tampoco se alimenta sin su huésped, con esto la problemática que envuelve el hongo es principalmente para mantener la viabilidad de la roya para desarrollar estrategias para su control. En el periodo del año con temperaturas de 18 a 30°C (marzo-septiembre) no se observa visualmente los síntomas del patógeno en campo, la sintomatología y afectación del cultivo es principalmente en el periodo de otoño invierno (octubre-febrero). Debido a estos factores se ha hecho difícil el estudio de su biología y fisiología. Además, después de ser colectada la roya para su estudio en el laboratorio pierde viabilidad con rapidez si se conserva a temperatura ambiente (a los 30 días se tiene un 50% de uridenosporas viables) por lo que actualmente se busca desarrollar estrategias de conservación y reproducción manteniendo el mayor porcentaje de viabilidad para estudios y control en periodos de mediano y largo plazo.

De acuerdo con la dinámica del hongo en campo, el mejor método de control actual son los manejos culturales, principalmente con las hojas contaminadas en campo que deben ser retiradas para evitar la contaminación en el ambiente, ya que el hongo se disemina y mantiene su ciclo con ayuda del viento, siendo la mejor estrategia la prevención, ya que la propagación de la enfermedad es rápida, debido que el inóculo siempre está presente mismo sin presentar síntomas en planta, y

cuando hay condiciones climáticas favorables se visualiza sus principales daños iniciales, que se vuelven severos causando defoliación del cultivo sin un control químico eficaz.

6. JUSTIFICACIÓN

La roya (*Thekopsora mínima*) es un hongo que se reproduce a través de uredosporas, las uredosporas son dicarióticas y contienen un par de núcleos. Se dispersan por el viento y germinan en la superficie de las hojas en condiciones húmedas cuando es probable que los estomas están abiertos, favoreciendo su desarrollo germinativo. Cuando el tubo germinativo localiza un estoma, se infla sobre la abertura, formando un apresorio, y penetra en la hoja. El micelio infeccioso se desarrolla entre las células de las hojas y produce ramas llamadas haustorios, que penetran las paredes de la célula huésped. Los haustorios forman una estrecha conexión con la célula huésped sin destruir su membrana plasmática, lo que favorece la absorción sostenida de nutrientes de la planta viva, en un segundo estadio del desarrollo de la enfermedad la misma causa el fenómeno conocido como defoliación de la planta, menor crecimiento y falta de vigor causando un gran desequilibrio nutricional y energético del vegetal.

La roya puede completar múltiples rondas de producción y liberación de uredosporas e infección, lo que permite que la enfermedad se propague como una epidemia entre huéspedes susceptibles en una amplia región. Sin embargo, por ser un parásito obligado, dificulta el estudio de su biología, así que se tiene poco entendimiento de la enfermedad y por lo tanto se ha dificultado generar estrategias eficaces de control. Además de lo anterior, se pierde viabilidad de las uredosporas muy rápido (a los 30 días se tiene 50% de viabilidad) y no se han generado protocolo de infección de roya en plantas sanas para su estudio en etapas tempranas. Por lo anterior es necesario implementar estrategias de conservación de roya para mantener viables las uredosporas por períodos más largos y así encontrar la mejor opción para su control, debido a que la investigación del género (*Thekopsora mínima*) es poco estudiada y los daños causados en producción incrementan el valor de mantenimiento del cultivo incrementando los costos de producción lo cual afectando directamente la cadena de exportación.

7.OBJETIVOS

7.1 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar métodos de conservación e inoculación de roya (*Thekopsora mínima*) en plantas de arándano *in vitro* y *ex vitro*.

7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer procesos de desinfección y purificación de roya
- Realizar métodos de infección de roya en arándano *in vitro*
- Establecer métodos de conservación para la roya por medio de la liofilización y crioconservación.
- Establecer métodos de viabilidad de las uredosporas y aplicarlo durante las diferentes etapas de conservación (liofilización y crioconservación)

9. DESARROLLO

9.1 DESARROLLO DE LAS ACTIVIDADES

9.1.1 Establecimiento de tratamientos para evaluar la viabilidad de la hoja de arándano sin ser infectada de roya (*Thekopsora mínima*).

Se realizaron evaluaciones de viabilidad de hojas de arándano, las cuales constan de cuatro tratamientos que se colocaron a temperatura ambiente en dos cámaras húmedas en cada una había dos tratamientos, en la primera cámara húmeda se colocó un tratamiento en caja Petri con tres hojas enteras y otro tratamiento en caja Petri con sanitas y tres hojas enteras, en la segunda cámara húmeda se colocó un tratamiento en caja Petri con foamy y tres hojas enteras y otro tratamiento en caja Petri con sanitas, foamy y tres hojas enteras.

Se colocaron los tratamientos de acuerdo con las condiciones que se indican en la tabla 2.

Tabla 2. Condiciones de cada uno de los tratamientos de integridad de hoja

Caja Petri de vidrio	Base en caja Petri	Caja Petri humedad interior	Humedad exterior (recipiente con agua y sanitas)	Hojas	Número de Repeticiones
Tratamiento 1	No	No	Si	Enteras	3 hojas
Tratamiento 2	Sanitas	No	Si	Enteras	3 hojas
Tratamiento 3	Foamy	No	Si	Enteras	3 hojas
Tratamiento 4	Sanita y foamy	No	Si	Enteras	3 hojas

1. Temperatura inicial de 20°C
2. Todo el material se esterilizó previamente
3. Desinfección de hojas en alcohol al 70% en un minuto.

4. Se pasan las hojas en agua estéril para eliminar residuos de alcohol.
5. Se secan las hojas.
6. Se colocan 25 mililitros de agua en el recipiente 1 para tratamiento 1 y 2.
7. Se colocan 25 mililitros de agua en el recipiente 2 para tratamiento 3 y 4.
8. Se colocan las hojas en la caja Petri con su debido tratamiento.
9. Se sellan las cajas Petri.
10. Se sellan los recipientes para evitar fuga de humedad
11. Se evaluaron cada 7 días.

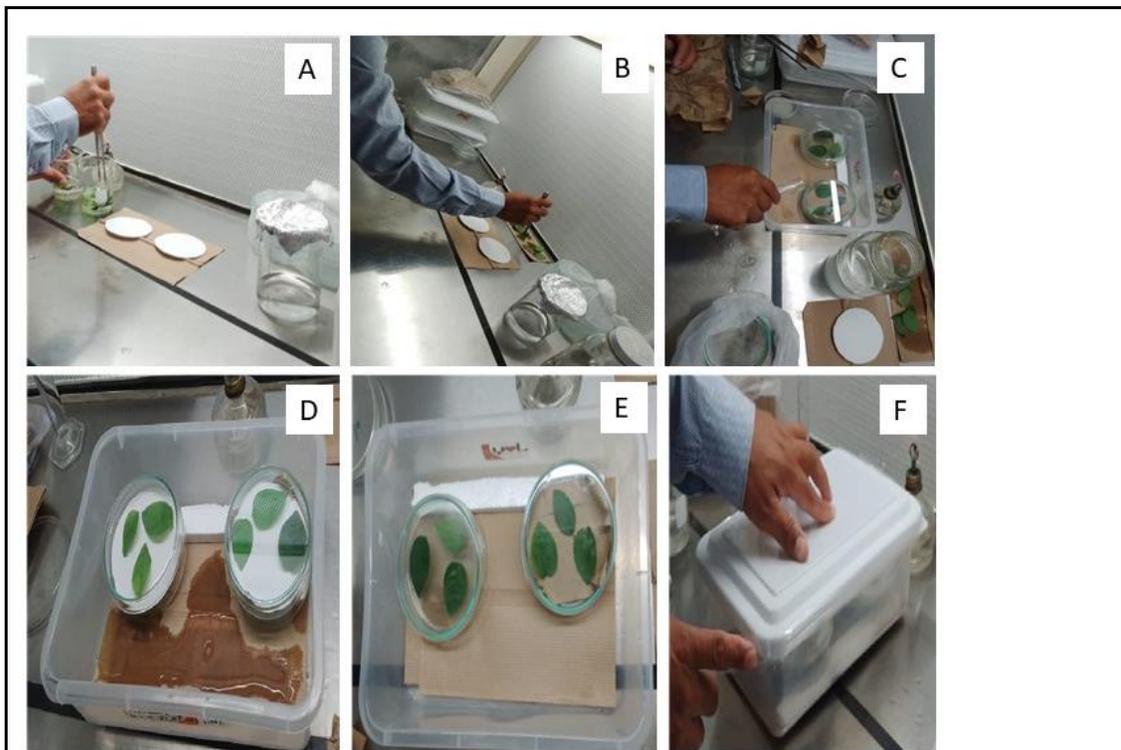


Figura 9. Establecimiento del experimento de integridad de hoja en condiciones asépticas. A. desinfección de hojas de arándano en etanol, B. secado de hojas de arándano, C. colocación de agua para Cámara húmeda, D. resultado de cámara húmeda, E. experimento antes de agregar humedad, F. sellado de cámara húmeda.

9.1.2 Pruebas de liofilización de crioprotectores.

Se realizaron pruebas de liofilización con lioprotectores y crioprotectores los cuales fueron leche descremada, glicerol y trehalosa para evaluar sus aspectos físicos y determinar cuál es la mejor opción solución a utilizar para la liofilización de roya. En la tabla 2 se muestran las soluciones que se efectuaron, es importante mencionar que se emplearon estas soluciones estériles y no estériles.

Tabla 3 Tratamientos para el proceso de liofilización			
Tratamiento	Lioprotector	Crioprotector	
		Leche descremada [%]	Glicerol [%]
L10	10		
L20	20		
T1		1	
T10		10	
G1			1
G10			10
L10T1	10	1	
L10T10	10	10	
L10G1	10		1
L10G10	10		10
L20T1	20	1	
L20T10	20	10	
L20G1	20		1
L20G10	20		10

Para realizar la prueba de liofilización:

1. Se prepararon 10mL de las soluciones que se muestran en la tabla 2, basadas en sus cálculos correspondientes.
2. Cinco mL se esterilizaron por autoclave y los otros 5mL NO se esterilizaron.
3. Se evaluó las características físicas de las soluciones
4. Se colocaron 300 microlitros de la solución en tubos eppendorf con capacidad de 2mL
5. Se congelaron a - 80° por 24 horas
6. Se conectan a la liofilizadora por 24 horas
7. Se realiza evaluación visual de características físicas y de solubilidad
8. Se agregaron 3 microlitros de agua destilada a cada tubo eppendorf para evaluar la disolución de las pastillas que se crearon después de la liofilización.

9.1.3 Inoculación de roya en hojas de arándano

Se establece experimento de inoculación de roya en hojas y plantas de arándano.

Las soluciones para la infección de roya en hojas fueron con concentraciones de 1×10^2 , 1×10^3 y 1×10^4 uredosporas/mL.

Se realizó la desinfección de hojas en etanol y agua destilada, para después proseguir con el establecimiento de los experimentos. Los experimentos fueron puestos en cajas petri, con cuatro sanitas previamente cortadas a la medida, a cada caja petri se le agregó cinco mililitros de agua y el inóculo con sus debidas concentraciones. Estas fueron puestas en cajas para su posterior evaluación. El material utilizado fue previamente esterilizado en autoclave.

9.1.4 Inoculación de roya en plantas *in vitro* de arándano

El medio que se utilizó en las plantas de arándano *in vitro* fue, macronutrientes+micronutrientes+agar en concentraciones X2, X3 y X4, medio MS sin sacarosa.

Las soluciones para infección de roya en plantas fueron con concentraciones de 1×10^2 , 1×10^3 y 1×10^4 uredosporas/mL.

9.1.5 Liofilización de roya en crioprotectores

Para realizar una correcta liofilización, es necesario evaluar antes la viabilidad de las uredosporas. La evaluación se realiza mediante dos métodos, uno es en cajas petri y otro en cámara de Neubauer.

Se utilizaron uredosporas de Roya de arándano *Thekopsora mínima* como inóculo con la finalidad de prolongar la viabilidad (6-12 meses) mediante diferentes métodos de conservación. Se colectaron las hojas con pústulas visibles (uredosporas), posteriormente se realizó el raspado colectándose en un tubo falcón, previo a esto, se llevó a cabo la preparación de lioprotectores (evaluados con anterioridad) a diferentes concentraciones. Entre los lioprotectores y concentraciones utilizadas durante los diferentes métodos de conservación se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Agentes lioprotectores con sus respectivas concentraciones utilizados en los procesos de conservación.

LIOFILIZACIÓN		
Lioprotector / crioprotector	Concentración [%]	Temperatura de conservación
Leche descremada	10%	4°C -20°C -80°C
Trehalosa	10%	
Glicerol	10%	
Leche descremada + Trehalosa	10%+1%	
Leche descremada + Glicerol	10%+1%	
CRIOCONSERVACIÓN		
Crioprotector	Concentración [%]	Temperatura de conservación
Glicerol	10%	-20°C
Trehalosa	10%	-80°C
Glicerol + Trehalosa	10%+1%	
Glicerol	35%	

La concentración de inóculo utilizada para la conservación fue de 1×10^4 , para lo cual se llevó a cabo el conteo de células con ayuda de una cámara de Neubauer en un microscopio óptico con un aumento de 10X.

Los métodos de conservación utilizados fueron por crioconservación y liofilización, el proceso de liofilización se llevó a cabo en un liofilizador en el laboratorio de Bioquímica Vegetal del Instituto Tecnológico de Tlajomulco. Con una rampa de congelación de $-3^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta alcanzar los -50°C , para luego iniciar la sublimación con una rampa de calentamiento de $0,5^\circ\text{C}/\text{min}$ sin exceder los -20°C a una presión de 1200 mTorr aproximadamente.

9.1.6 DETERMINACIÓN DE CÉLULAS VIABLES

Antes de llevarse a cabo los procesos de conservación, se realizó la evaluación de viabilidad, pureza y estabilidad morfológica de las uredosporas, bajo las siguientes metodologías:

Se realizaron 4 tratamientos en tubos eppendorf con capacidad de 2 mL con diferentes metodologías, para determinar la viabilidad de las uredosporas, en el tubo 1 y 2, se agregaron 150 μ L de la solución de esporas, se centrifugó a 10 000 rpm por 3 min y se eliminó el sobrenadante (agua) de cada tubo, se volvió agregar 150 μ L agua destilada estéril y 0.8 μ L de tetrazolio al 1% (TTC). De ambos tubos se tomaron 50 μ L agregándole en cajas Petri de 90mm y se dispersó la solución con una espátula de drygalsky, se incubaron a temperatura ambiente por tres horas. Mientras que el tubo 1 se guardó a 37°C por tres horas y el tubo 2 se centrifugó y se le agregó 120 μ L de TTC y se incubó por tres horas a 37°C. Se etiquetaron tubos 3 y 4 agregándole 100 μ L de solución de esporas a cada uno, en el tubo 3 se mantuvo a temperatura ambiente por 3 horas, 20 minutos antes de completarse las tres horas se agregó 100 μ L de TTC, mientras que el tubo 4 se eliminó el sobrenadante por centrifugación y se agregó 100 μ L de TTC, se mantuvo a temperatura ambiente por 3 horas.

Posteriormente se colocó 20 μ L de solución de cada uno de los tratamientos en la cámara de Neubauer y se realizó el conteo de uredosporas viables basado en la siguiente ecuación:

$$\Sigma C1+C2+C3+C4+C5$$

Al término de la incubación de cada uno de las pruebas se procedió a evaluar la viabilidad por microscopio a 100 campos.

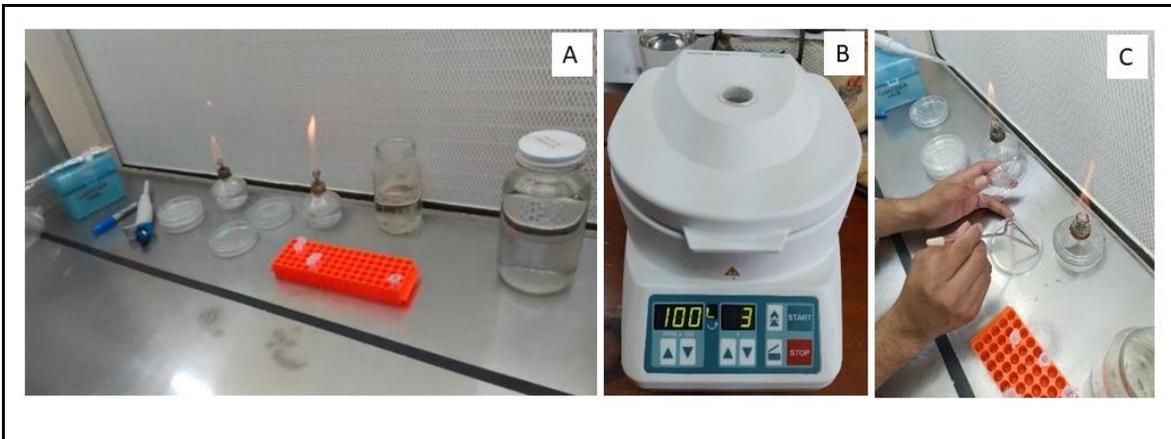


Figura 10. Perfil de preparación de muestras para evaluar la viabilidad. (A) Dispersión de inóculo en distintos tubos, (B) separación de fases de tubos con la solución y (C) siembra de esporas en agar agua.

10. RESULTADOS

10.1 Evaluaciones (Establecimiento de tratamientos para evaluar la viabilidad de la hoja de arándano sin ser infectada de roya (*Thekopsora mínima*))

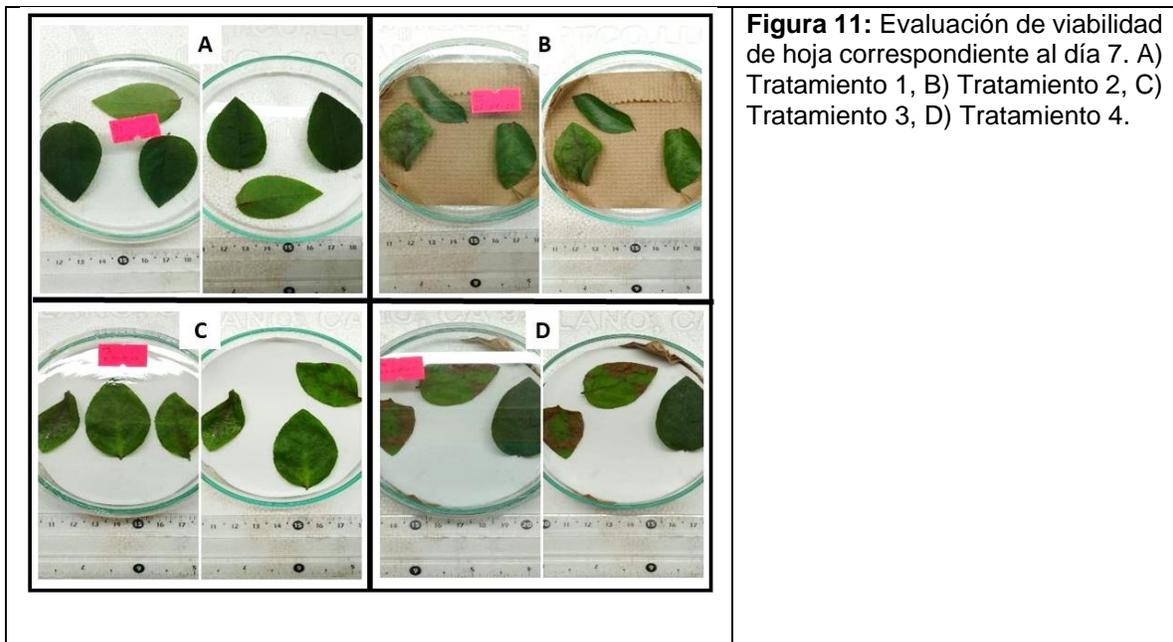
Evaluación 1. Correspondiente al día siete después de montar el experimento. Temperatura 20°C.

Tratamiento 1 (A). Sin daño aparente.

Tratamiento 2 (B). Se observa marchitez.

Tratamiento 3 (C). Se observan manchas grisáceas irregulares

Tratamiento 4 (D). Se observa necrosis de los bordes hacia el centro.



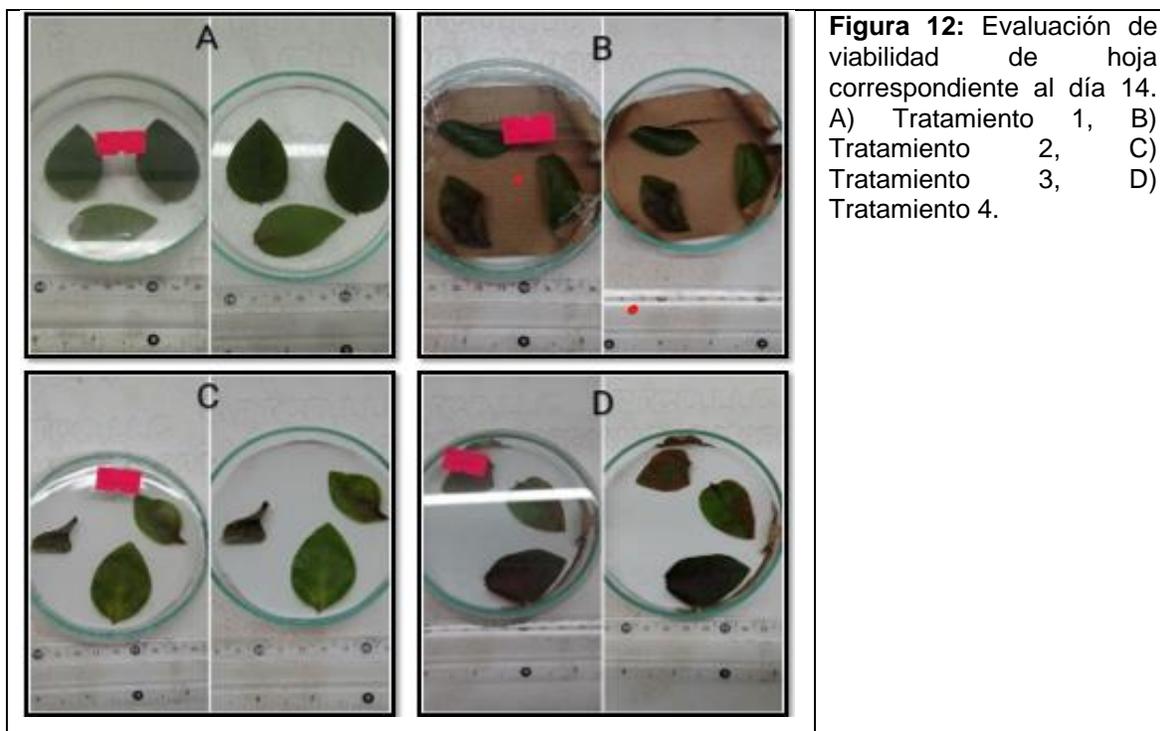
Evaluación 2. Correspondiente al día catorce después de montar el experimento. Temperatura 19.7.

Tratamiento 1 (A). Dos hojas íntegras y en una comienza a presentarse necrosis en el envés de la hoja con señal de senescencia natural.

Tratamiento 2 (B). Una hoja necrótica, dos hojas arrugándose hacia arriba una presenta color verde más oscuro que la otra, aparentemente sin daño necrótico las dos.

Tratamiento 3 (C). Una hoja 95% necrótica, arrugada hacia arriba. Otra hoja comienza con manchón necrótico en el centro. La última hoja con amarillamiento en la nervadura central. Las tres hojas presentan un tono verde claro.

Tratamiento 4 (D). Manchones necróticos de la evaluación anterior, se tornan con un color café más intenso y aumentaron en tamaño.



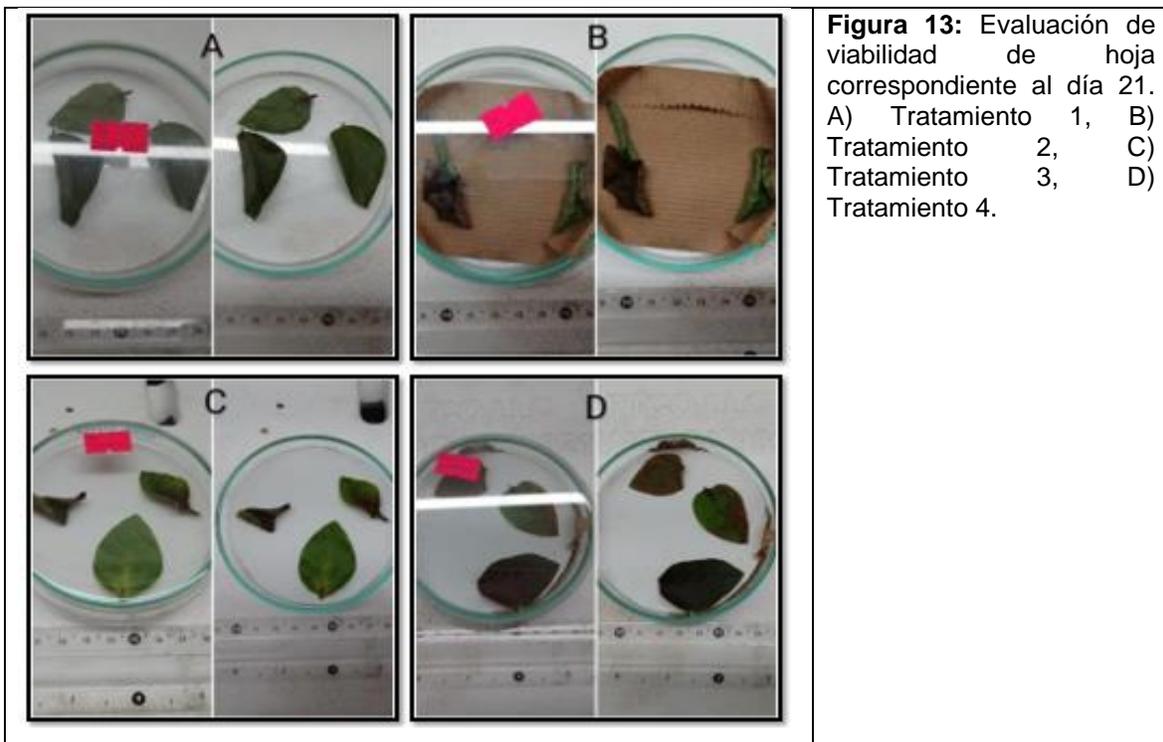
Evaluación 3. Correspondiente al día veintiuno después de montar el experimento.
Temperatura 20.6

Tratamiento 1 (A). Dos hojas con senescencia alta y arrugadas hacia arriba, una levemente arrugada.

Tratamiento 2 (B). Una hoja completamente necrótica, dos hojas arrugadas cerradas hacia arriba completamente.

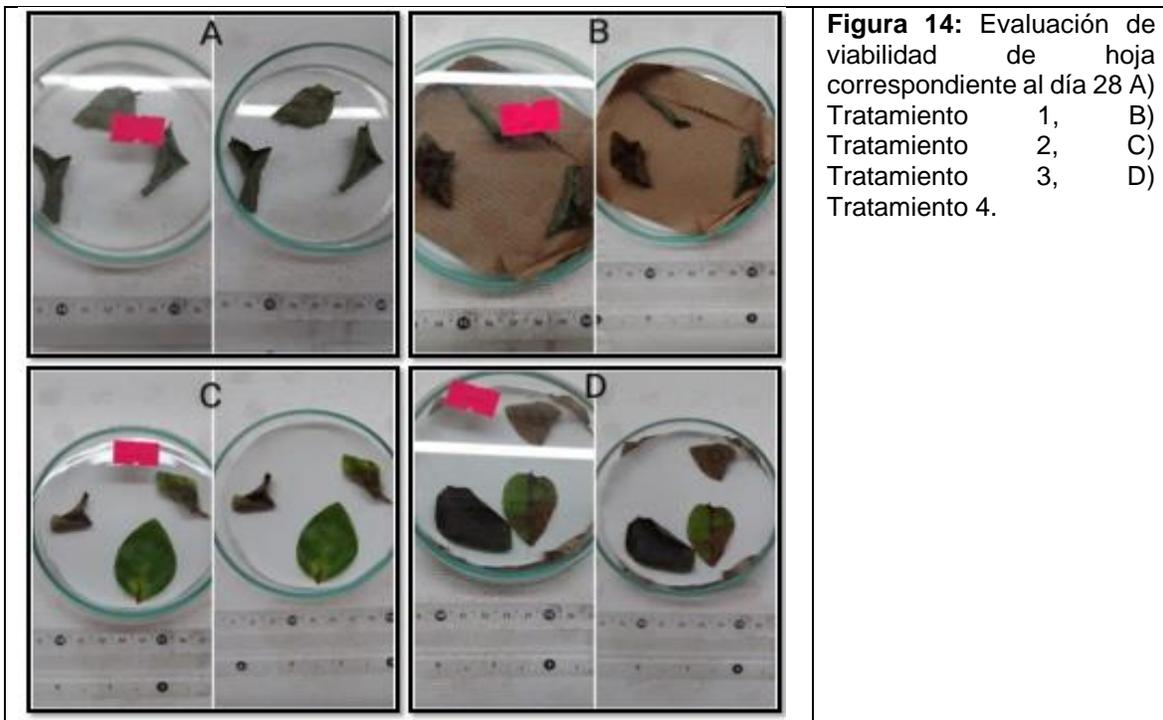
Tratamiento 3 (C). Una hoja arrugada con un 910% de necrosis, otra hoja con la base necrótica con los bordes y laterales en coloración verde, ultima hoja con manchón amarillo y la punta de la base necrótica.

Tratamiento 4 (D). Las tres hojas presentan manchones necróticos y arrugamiento. Dos de las hojas tienen presencia de hongos.



Evaluación 4. Correspondiente al día veintiocho después de montar el experimento

Se descartaron los tratamientos debido a que las hojas ya no se encontraron viables.



10.2 Evaluaciones (Pruebas de liofilización de crioprotectores)

Para el proceso de liofilización se prepararon diferentes soluciones con lioprotectores y crioprotectores, los cuales se evaluó la apariencia física de las soluciones esterilizadas en autoclave y sin esterilizar antes de efectuar el proceso de liofilización, como se muestra a continuación en la Tabla 5.

Tabla 5. Pruebas de liofilización de crioprotectores		Autoclaveado		
Soluciones (no esteril)	Aspectos físicos		No	Si
	Color	Consistencia		
L10	Blanco	Líquido	*	
L20	Blanco	Líquido	*	
T1	Transparente	Líquido	*	
T10	Transparente	Líquido	*	
G1	Transparente	Líquido	*	
G10	Transparente	Líquido	*	
L10T1	Blanco	Líquido	*	
L10T10	Blanco	Líquido	*	
L10G1	Blanco	Líquido	*	
L10G10	Blanco	Líquido	*	
L20T1	Blanco	Líquido	*	
L20T10	Blanco	Líquido	*	
L20G1	Blanco	Líquido	*	
L20G10	Blanco	Líquido	*	



Figura 15: Soluciones de crioprotectores no estériles.

Como se observó en las soluciones que se esterilizaron, estas cambiaron su coloración a un color beige en aquellas soluciones que contenían leche descremada, lo cual puede ser un indicador de que en el proceso de esterilización tuvo un efecto adverso en la solución. Lo que tuvo como consecuencia la caramelización de la lactosa y en combinación con los crioprotectores a concentraciones más elevadas la consistencia fue gelatinosa, como se describe a continuación en la tabla 6.

Tabla 6.	Pruebas de liofilización de crioprotectores			
Soluciones (estéril)	Aspectos físicos		Autoclaveado	
	Color	Consistencia	No	Si
L10	Beige	Líquido		*
L20	Caqui	Gelatinoso		*
T1	Transparente	Líquido		*
T10	Transparente	Líquido		*
G1	Transparente	Líquido		*
G10	Transparente	Líquido		*
L10T1	Beige	Líquido		*
L10T10	Beige	Líquido		*
L10G1	Beige	Líquido		*
L10G10	Beige	Líquido-granulado		*
L20T1	Caqui	Gelatinoso		*
L20T10	Caqui	Gelatinoso		*
L20G1	Caqui	Gelatinoso		*
L20G10	Caqui	Gelatinoso		*

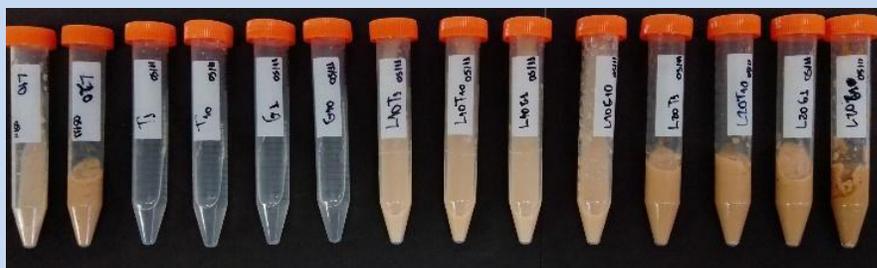


Figura 16: Soluciones de crioprotectores estériles.

10.3 Evaluación de soluciones liofilizadas

Después de efectuar el proceso de liofilización a las soluciones se evaluó las características físicas de las pastillas, cabe mencionar que faltaron algunos tratamientos por liofilizar, por lo que no se pudo efectuar la evaluación de los mismos. A continuación, en la tabla 7, se muestran las observaciones de las soluciones liofilizadas que no fueron esterilizadas.

Tabla 7. Soluciones liofilizadas no estériles					
Solución (no esteril)	Color	Estructura	Pastilla	Características	Salpicaduras
L10	Blanco	Sólida	Si	Deforme	Si
L20	Transparente	Sólida	No	No se formó	Si
T1	Transparente	Sólida	No	No se formó	Si
T10	Transparente	Sólida	No	No se formó	Si
G1	Sin solución				
G10	Transparente	Sólida	No	No se formó	Si
L10T1	Blanco	Sólida	No	Burbujeante	Si
L10T10	Blanco	Sólida	Si	Porosa	Si
L10G1					
L10G10					
L20T1					
L20T10					
L20G1					
L20G10					



Figura 17: Estructura de las pastillas de soluciones no estériles.

A continuación en la tabla 8, se muestran las observaciones de las soluciones liofilizadas que fueron esterilizadas

Tabla 8.	Soluciones liofilizadas estériles				
Solución (esteril)	Color	Estructura	Pastilla	Características	Salpicaduras
L10	Beige	Sólida	Si	Completamente formada	No
L20	Caqui	Sólida	Si	Quebradiza	No
T1	Transparente	Sólida	No	No se formó	No
T10	Transparente	Sólida	No	No se formó	No
G1	Transparente	Sólida	No	No se formó	No
G10	Transparente	Gelatinoso	No	No se formó	Si
L10T1	Beige	Sólida	Si	Completamente formada	Si
L10T10	Caqui	Burbujeante	No	Deforme	Si
L10G1	Beige	Sólida	Si	Porosa	No
L10G10	Caqui	Viscosa	No	No se formó	Si
L20T1	Café	Sólida	Si	Desproporción	Si
L20T10	Café	Sólida	Si	Desproporción	No
L20G1	Beige	Sólida	Si	Quebradiza	Si
L20G10	Café	Viscosa	No	No se formó	Si



Figura 18: Estructura de las pastillas de soluciones estériles.

10.4 Evaluación (Disolución de crioprotectores)

A continuación, en la tabla 9, se muestran las observaciones, después de agregar el disolvente a las pastillas liofilizadas.

Tabla 9	Disolución de crioprotectores		
Solución estéril	Características	Solución no estéril	Características
L10	Disuelto	L10	Disuelto
L20	Gelatinoso - Grumoso	L20	Disuelto
T1	Disuelto	T1	Disuelto
T10	Disuelto	T10	Disuelto
G1	Disuelto	G1	Disuelto
G10	Disuelto	G10	Disuelto
L10T1	Disuelto	L10T1	Disuelto
L10T10	Disuelto	L10T10	Disuelto
L10G1	Disuelto	L10G1	
L10G10	Disuelto	L10G10	
L20T1	Gelatinoso - Grumoso	L20T1	
L20T10	Gelatinoso - Grumoso	L20T10	
L20G1	Gelatinoso - Grumoso	L20G1	
L20G10	Gelatinoso - Grumoso	L20G10	

A continuación, en la Figura 19, se muestran las fotos de las soluciones que se sometieron a liofilización y su posterior hidratación con el disolvente.

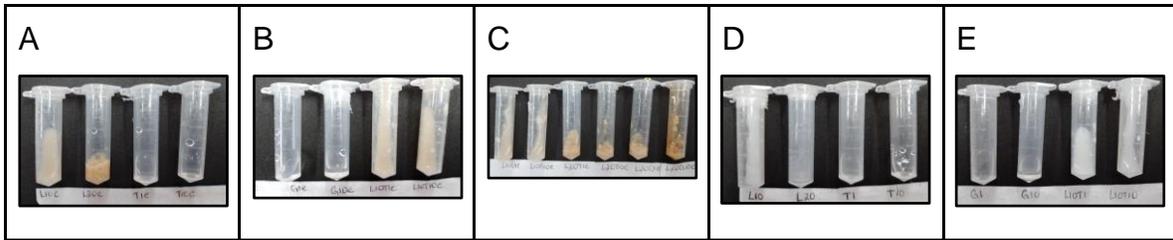
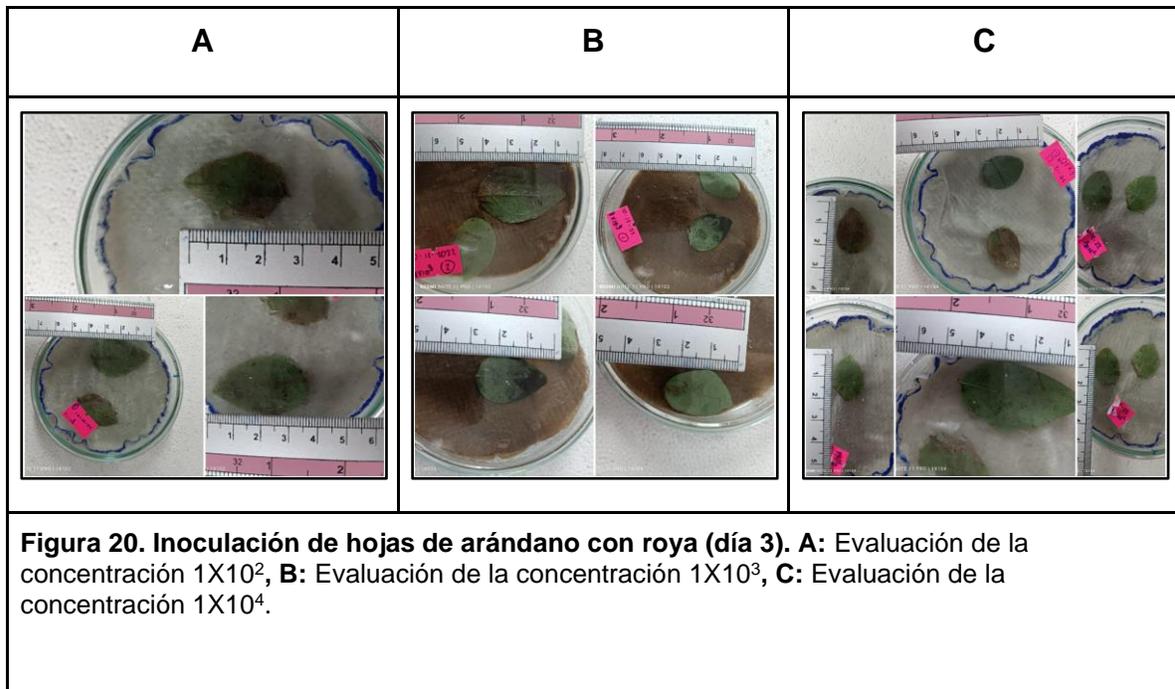


Figura 19. Muestras liofilizadas e hidratadas con el disolvente. A) Tratamientos estériles con Lactosa (10 y 20%) y trehalosa (1 y 10%); B) Tratamientos estériles con glicerol (1 y 10%) y mezcla de 10% de lactosa con trehalosa al 1 y 10%; C) Tratamientos estériles con mezclas de 10% de lactosa con glicerol (1 y 10%) y mezcla de 20% de lactosa con trehalosa al 1 y 10% y mezcla de 20% de lactosa con glicerol (1 y 10%); D) Tratamientos sin esterilizar con Lactosa (10 y 20%) y trehalosa (1 y 10%); E) Tratamientos sin esterilizar con glicerol (1 y 10%) y mezcla de 10% de lactosa con trehalosa al 1 y 10%.

10.5 Evaluaciones (Inoculación de roya en hojas de arándano) Correspondiente al tercer día después de la inoculación.

Se realizó la inoculación de roya en hojas *in vitro* y se realizó la evaluación de la sintomatología.

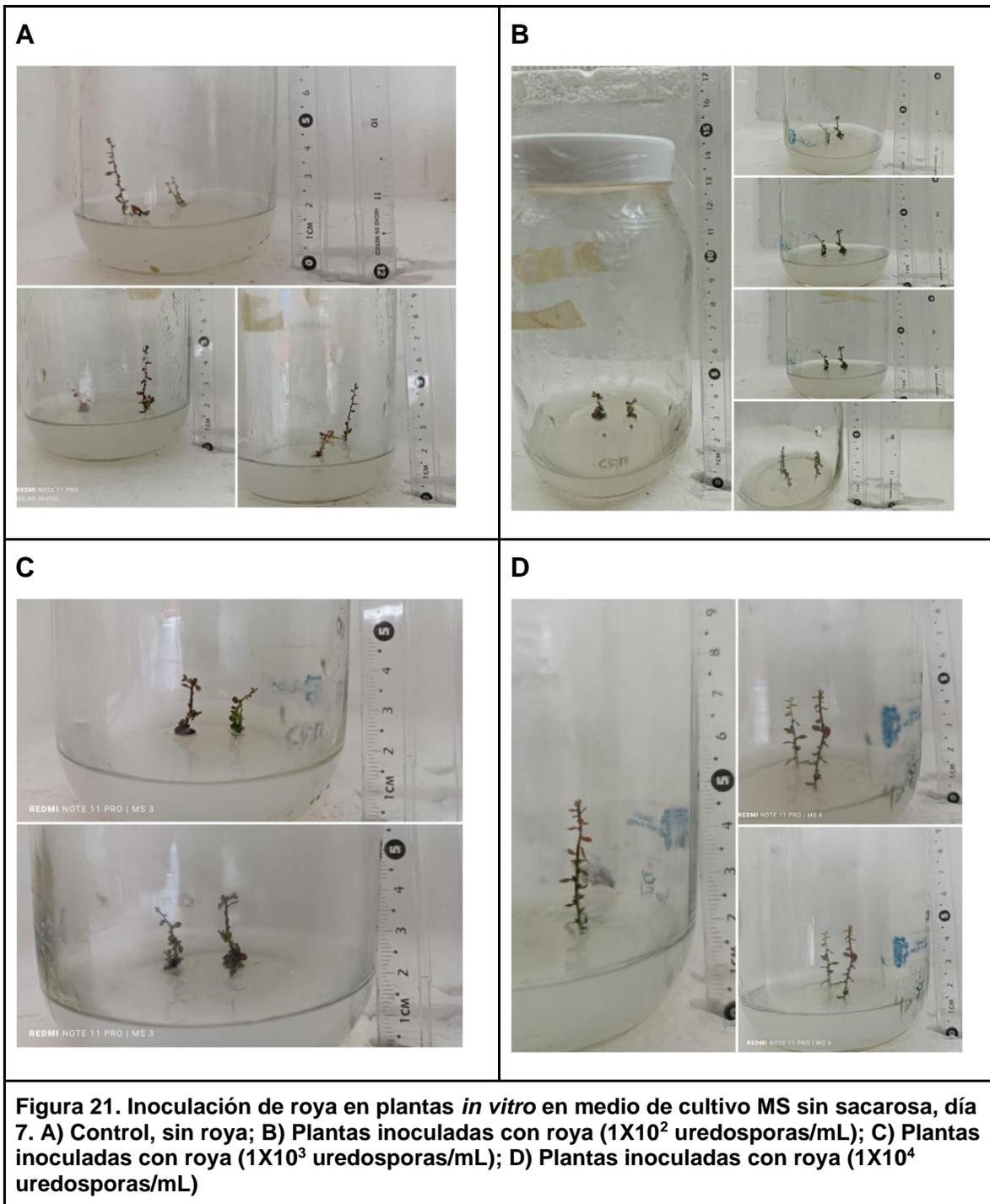
En esta evaluación se pudo observar como las hojas comenzaron a necrosar después de la inoculación de roya, aún sin presentar síntomas de infección ni uredosporas de *Thekopsora minima* en las tres diferentes concentraciones (Fig. 20).



10.6 Evaluaciones (Inoculación de roya en plantas *in vitro* de arándano) Correspondiente al día siete después de la inoculación.

Se realizó la inoculación de roya en plantas *in vitro* y se realizó la evaluación de la sintomatología.

En esta evaluación se observó en el medio de las plantas no inoculadas (control) y de las diferentes concentraciones, se contaminó con microorganismos y las plantas muestran síntomas de senescencia, no logra verse daño de la inoculación ni uredosporas de *Thekopsora mínima* en ninguna de las concentraciones, solo se observan hojas necróticas y cloróticas (Fig. 21).



En esta evaluación se observó como se comenzaron a necrosar algunas hojas de las plantas de todas las concentraciones y el medio contaminado con microorganismos, no logra verse daño con la inoculación de *Thekopsora mínima*.

En el caso de la planta que no está inoculada (control) podemos ver que una planta está en senescencia.

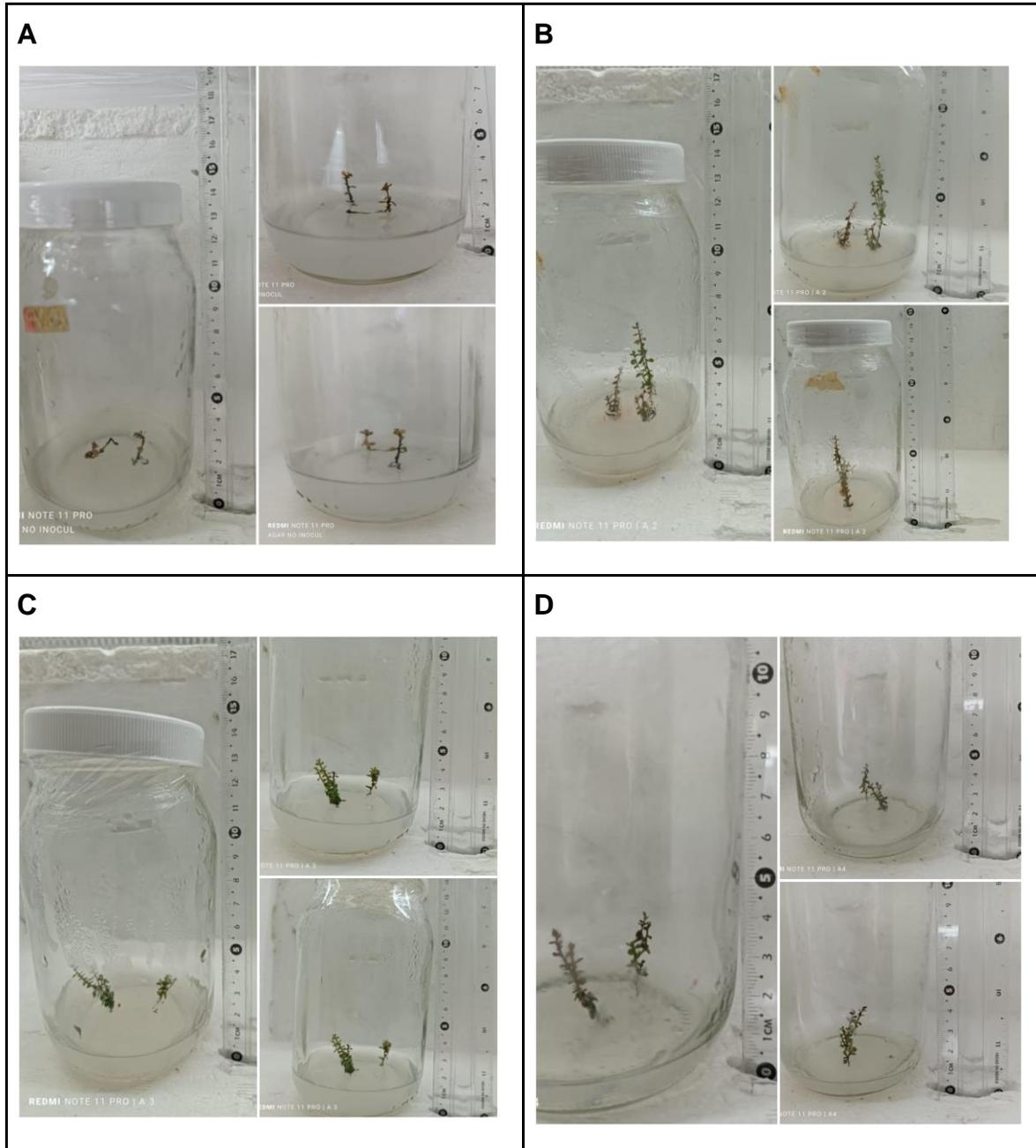


Figura 22. Inoculación de roya en plantas *in vitro* en sales de macronutrientes, micronutrientes del medio de cultivo MS y agar, día 7.

A) Control, sin roya; B) Plantas inoculadas con roya (1×10^2 uredosporas/mL); C) Plantas inoculadas con roya (1×10^3 uredosporas/mL); D) Plantas inoculadas con roya (1×10^4 uredosporas/mL)

11.CONCLUSIONES

- Evaluación viabilidad de las hojas de arándano

El mejor tratamiento de los cuatro establecidos en cámara húmeda, fue el tratamiento número 1 , dicho tratamiento no presentaba ningún tipo de base en la caja Petri y no tenía humedad interior. En el transcurso de las evaluaciones no se observó contaminación por otros hongos que afectan la hoja, la cual se mantuvo verde hasta el día 7, ya en el día 14 la hoja se encontraba fenolizada (senescencia natural).

En los otros tres tratamientos, el deterioro fue constante, presentándose amarillamiento y senescencia en las hojas, en el tratamiento cuatro fue evidente la presencia de otros hongos, lo que influyó en la fenolización prematura de la hoja.

- Evaluación de física de soluciones de lioprotectores y crioprotectores

Las mejores soluciones donde se efectuó el proceso de liofilización sin ningún problema fueron la Leche al 10%, la Trehalosa al 10%, el Glicerol al 10%, la Leche al 10% con Trehalosa al 1% y la Leche al 10% con Glicerol al 1%. Los tratamientos con leche al 20%, glicerol al 20% y sus mezclas, no se formaron adecuadamente las pastillas después de la liofilización ya que presentaban salpicaduras a lo largo del tubo eppendorf.

- Disolución de crioprotectores

De las soluciones estériles que se evaluaron, las que no tuvieron buena disolución fueron las que tenían leche al 20%, los factores que afectaron la disolución fueron que se esterilizaron y tenían mayor concentración de leche. En cambio, las que no fueron esterilizadas, todas tuvieron buena disolución.

Por lo tanto, se realizará la liofilización de roya con las primeras cinco soluciones.

- DETERMINACIÓN DE CÉLULAS VIABLES

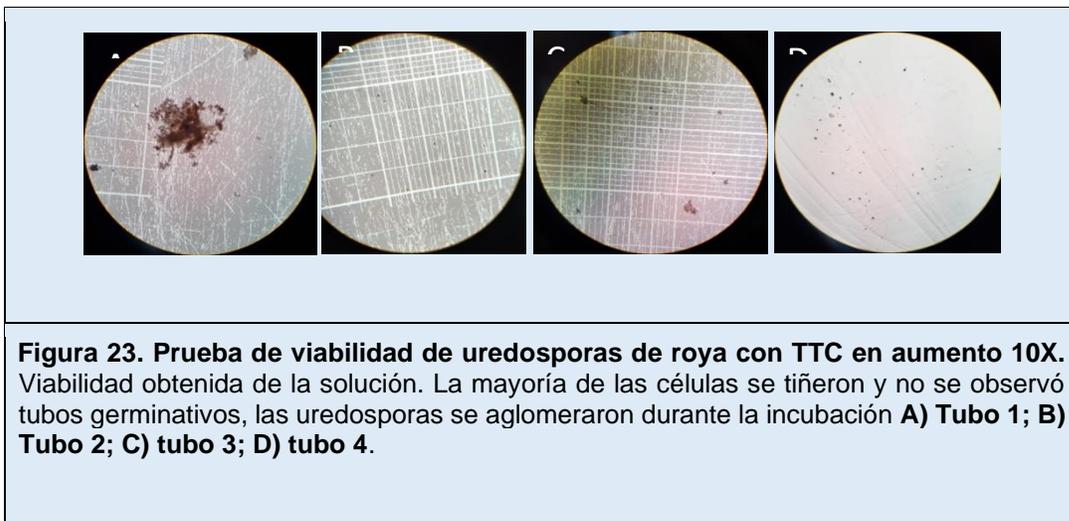
Los procesos de conservación de microorganismos nos permiten conservarlos viables por tiempo prolongados, como el caso de liofilización que es un método ampliamente utilizado para la conservación debido a que permite que estos mantengan su viabilidad a temperatura ambiente por largos períodos de tiempo con una buena estabilidad genética. Dado que es un proceso físico de deshidratación, donde el agua pasa por diferentes fases, las células pueden verse afectadas estructuralmente disminuyendo su viabilidad. Es por esto por lo que es muy importante el uso de agentes lioprotectores los cuales protegen a las células de los daños causados durante la liofilización, los cuales ayudan a evitar que las células sufran daños intra y extracelulares y mueran durante la deshidratación. Algunos productos utilizados en este proceso (trehalosa, lactosa, maltosa y sacarosa) (Leslie et al., 1995), la leche descremada y diversos polialcoholes, han mostrado gran eficacia como agentes lioprotectores (Berny y Hennebert, 1991; MacKenzie, 1977). Así como la conservación de muestras biológicas almacenadas en refrigeración (-20 y -80°C). Por lo que en este estudio se emplearon como lioprotector la leche descremada combinada con crioprotectores como es el glicerol y la trehalosa

En este proceso se llevó a cabo la reducción de las células vivas que toman el hidrógeno liberado por las enzimas deshidrogenasas y forma una sustancia roja, estable y no difusible, el trifenil-formazan. Como indicador referenciado, las semillas viables, se tornan completamente, y las que no se colorean se consideran semillas muertas. La viabilidad expresa el potencial de una semilla para germinar (ISTA, 1999).

Para determinar cuál método de criopreservación es el más adecuado para el proceso de conservación de la roya es importante establecer métodos que nos ayuden a determinar la viabilidad de las uridenosporas, por lo que en este trabajo se realizó el establecimiento de la viabilidad de la roya con el uso de Cloruro de tetrazolio (TTC). Como resultados finales de la evaluación obtenida en solución de TTC y agar agua fue la siguiente (Fig. 15).

Del tubo 1 se pudo observar una tinción tenue (rojo bajo) en la mayoría de células, no se observó células germinadas, mientras que en el tubo 2 se observaron células germinadas con una tinción baja, por los campos cuantificados se pudo cuantificar un 65% de células germinadas.

En el tubo 3 se pudo observar uredosporas germinadas con poca tinción. Respecto al tubo 4 se observó poca colorimetría y en la caja Petri se pudo observar todas las células teñidas para las pruebas de viabilidad. La mayoría de las células se tiñeron y no se observó tubos germinativos, las uredosporas se aglomeraron durante la incubación **A-D)**



12.FUENTES DE INFORMACIÓN

12.1 BIBLIOGRAFÍA

1. Anco, D. J., & Ellis, M. A. (2011, June 22). Fruit Rots of Blueberry: Alternaria, Anthracnose, and Botrytis. Ohioline. Retrieved November 25, 2022, from <https://ohioline.osu.edu/factsheet/plpath-fru-44>
2. Angulo, A., Matamoros, R., & Gómez-Alpizar, L. (2015). MICROPROPAGACIÓN DE CUATRO CULTIVARES DE ARÁNDANO (*Vaccinium* spp.) A PARTIR DE SEGMENTOS FOLIARES DE DOS PROCEDENCIAS. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Retrieved November 21, 2022, from http://www.mag.go.cr/rev_agr/v39n01_007.pdf
3. Cazar, J. (2021). Micropropagación de arándano azul (*Vaccinium corymbosum* L.): Revisión de literatura. Retrieved December 9, 2022, from <https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/616d642e-c74c-4d4b-903c-3f73314b46bc/content>
4. Craig, G. (2021). Berry plant protection guide 2021–22. NSW Department of Primary Industries. Retrieved December 1, 2022, from https://www.dpi.nsw.gov.au/_data/assets/pdf_file/0006/566349/Berry-plant-protection-guide-2021.pdf
5. Das, I. K., & Rajendrakumar, P. (2016). Disease Resistance in Sorghum. Biotic Stress Resistance in Millets, 23–67. doi:10.1016/b978-0-12-804549-7.00002-0
6. Defilippi, B., Robledo, P., & Becerra, C. (2013). Manejo de cosecha y poscosecha en arándano. Undurraga, P. & Vargas, S. Manual de Arándano. Centro Regional de Investigación Quilamapu. Instituto de Investigaciones Agropecuarias–INIA.
7. Department for Environment and Heritage. (2009). Phytophthora is killing our plants! Department for Environment and Water. Retrieved November 24, 2022, from: <https://cdn.environment.sa.gov.au/parks/docs/anstey-hill-recreation-park/pa-gen-phytophthorabroch.pdf?v=1610572403>

8. Department of Primary Industries and Regional Development. (2022, Abril). Biosecurity alert: Blueberry rust. Retrieved December 1, 2022, from <https://www.agric.wa.gov.au/sites/gateway/files/Blueberry%20rust%20factsheet.pdf>
9. Doria, M. d. C., & Chavailli, A. (2010). USO DE LA TREHALOSA COMO CRIOPROTECTOR DE MICROORGANISMOS INMOVILIZADOS EN HIDROGELES POLIMERICOS. Retrieved December 9, 2022, from https://smbb.mx/congresos%20smbb/puertovallarta03/TRABAJOS/AREA_VII/ORAL/OVII-10.pdf
10. Dung, J. (2021). Verticillium Wilt in the Pacific Northwest | Pacific Northwest Pest Management Handbooks. Pacific Northwest Pest Management Handbooks |. Retrieved November 25, 2022, from <https://pnwhandbooks.org/node/405/print>
11. Duplessis, S., Cuomo, C. A., Lin, Y.-C., Aerts, A., Tisserant, E., Veneault-Fourrey, C., Martin, F. (2011). Obligate biotrophy features unraveled by the genomic analysis of rust fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(22), 9166–9171. doi:10.1073/pnas.1019315108
12. Ford, A. (2022, January 13). Rust Fungus Overview & Life Cycle | What is Rust Fungus? Study.com. Retrieved December 2, 2022, from <https://study.com/learn/lesson/rust-fungus-overview-life-cycle.html>
13. Frías, P., Márquez, E., & Sarahí, M. (2014, 11). Preservación de *Streptococcus pyogenes* mediante liofilización utilizando leche descremada al 1% como agente crioprotector | Repositorio UNISON. Repositorio UNISON. Retrieved December 8, 2022, from <http://repositorioinstitucional.uson.mx/handle/20.500.12984/4537>
14. G. Newcombe. 2004, PATHOLOGY | Rust Diseases, Editor(s): Jeffery Burley, Encyclopedia of Forest Sciences, Elsevier, 2004, Pages 785-792, ISBN 9780121451608, <https://doi.org/10.1016/B0-12-145160-7/00069-7>.
15. Georgieva, M., & Kondakova, V. (2021, April 30). In vitro propagation of *Vaccinium corymbosum* L. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*®.

- Retrieved November 21, 2022, from <https://www.agrojournal.org/27/02-11.pdf>
16. González, J. (2019). SITUACIÓN ACTUAL Y PERSPECTIVAS DE LA PRODUCCIÓN DE BERRIES EN MÉXICO. Redalyc. Retrieved November 3, 2022, from <https://www.redalyc.org/journal/141/14161295012/14161295012.pdf>
 17. Gordó, M. (2008). Guía práctica para el cultivo de Arándanos en la zona norte de la provincia de Buenos Aires. Ministerio de agricultura ganadería y pesca Presidencia de la nación. https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-mg_0801.pdf
 18. Hardham, A. R., & Blackman, L. M. (2017). Phytophthora cinnamomi. Molecular Plant Pathology, 19(2), 260–285. doi:10.1111/mpp.12568
 19. IBO. (2022, February 15). Agronomics en Gráficos: México toma impulso en la producción de arándanos - Blueberry International Organization. International Blueberry. Retrieved November 3, 2022, from <https://www.internationalblueberry.org/2022/02/15/agronomics-en-graficos-mexico-toma-impulso-en-la-produccion-de-arandanos/>
 20. INTAGRI. 2017. El Cultivo de Arándano. Serie Frutillas Núm. 17. Artículos Técnicos de INTAGRI. México. 10 p.
 21. INTAGRI. 2019. Manejo de Enfermedades en Arándanos. Serie Fitosanidad, Núm. 119. Artículos Técnicos de INTAGRI. México. 12 p
 22. J.F. Hernandez Nopsa, S. Thomas-Sharma, K.A. Garrett, Climate Change and Plant Disease, Editor(s): Neal K. Van Alfen, Encyclopedia of Agriculture and Food Systems, Academic Press, 2014, Pages 232-243, ISBN 9780080931395, <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52512-3.00004-8>. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444525123000048>); Plant pathology; Viruses; Weather.
 23. Jiménez-Bonilla, V., & Abdelnour-Esquivel, A. (2013). Identificación y valor nutricional de algunos materiales nativos de arándano (*Vaccinium* spp).

24. Keith L., Sugiyama L., Strauss A., Kai R., Zee F. 2008. First Report of Leaf Rust of Blueberry Caused by *Pucciniastrum vaccinii* in Hawaii. *Plant Disease* Vol.92(11)
25. Lorrain, C., Gonçalves dos Santos, K. C., Germain, H., Hecker, A., & Duplessis, S. (2019). Advances in understanding obligate biotrophy in rust fungi. *New Phytologist*, 222(3), 1190–1206. doi:10.1111/nph.15641
26. Medeiros, C. M. O., Forell, F., Oliveira, A. T. D., & Rodrigues, J. L. (2002). Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*, 57(1), 327–344. doi:10.1016/s0093-691x(01)00674-4
27. Medina Gutiérrez, M., & Sánchez Sánchez, M. (2014). Producción y exportación de arándanos para Estados Unidos. Lima, Perú: Tesis para optar al grado académico de Magíster en Administración de Empresas.
28. Miles, T. (2020). Michigan Blueberry Facts: *Alternaria* Fruit Rot. MSU College of Agriculture and Natural Resources. Retrieved November 25, 2022, from <https://www.canr.msu.edu/blueberries/uploads/files/Blueberry%20Facts%20AlternariaRot-FinalWEB.pdf>
29. Morgan, C., & Vesey, G. (2009). Freeze-Drying of Microorganisms. *Encyclopedia of Microbiology*, 162–173. doi:10.1016/b978-012373944-5.00114-0
30. Münzenmayer, S. (2015). Pasos clave en el emprendimiento del cultivo del arándano en el Perú. Blueberries Consulting. Retrieved December 9, 2022, from https://cdn.blueberriesconsulting.com/2015/07/pdf_000178.pdf
31. New Nouveau Brunswick. (2010). Botrytis Blight of Wild Blueberry. Government of New Brunswick. Retrieved November 23, 2022, from <https://www2.gnb.ca/content/dam/gnb/Departments/10/pdf/Agriculture/WildBlueberries-BleuetsSauvages/0171100028-e.pdf>
32. Nicholas P. Money, Chapter 1 - Fungal Diversity, Editor(s): Sarah C. Watkinson, Lynne Boddy, Nicholas P. Money, *The Fungi* (Third Edition), Academic Press, 2016, Pages 1-

- 36,ISBN9780123820341,<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382034-1.00001-3>
33. Orozco, R. (2021). CURVAS DE PRODUCCIÓN PARA EL ARÁNDANO MEXICANO. *Hortifrut*. <https://cdn.blueberriesconsulting.com/2021/06/10-Rodrigo-Orozco-Hortifrut-Curvas-de-produccion-del-arandano-mexicano.pdf>
34. PIRSA. (2019). BLUEBERRY RUST-Thekopsora minima. Retrieved November 26, 2022, from: https://pir.sa.gov.au/_data/assets/pdf_file/0011/288839/Blueberry_Rust_Fact_Sheet_-_July_2019.pdf
35. Rebollar-Alviter, A., Dixon, L., & Castlebury, L. (2011, Junio). First Report of Leaf Rust of Blueberry Caused by *Thekopsora minima* in Mexico. *Plant Disease*. <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-12-10-0885>
36. Ruzić, D., Vujović, T., Cerović, R., Ostrolucka, M. G., & Gajdosova, A. (2012). MICROPROPAGATION IN VITRO OF HIGHBUSH BLUEBERRY (*VACCINIUM CORYMBOSUM* L.). *Acta Horticulturae*, (926), 265–272. doi:10.17660/actahortic.2012.926.36
37. SCCH. (2021, noviembre). Avances en el Cultivo de las Berries en el Trópico. *Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas*, (1). <https://soccolhort.com/wp-content/uploads/2021/12/Avances-en-el-cultivo-de-las-berries-en-el-tropico.pdf>
38. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (2017, noviembre). Arándano un fruto con maravillosas propiedades | Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural | Gobierno | gov.mx. Gobierno de México. Retrieved October 20, 2022, from <https://www.gob.mx/agricultura/es/articulos/arandano>
39. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (2018, agosto 25). Cultivo del arándano en México, reto superado | Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural | Gobierno | gov.mx. Gobierno de México. Retrieved October 29, 2022, from <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/cultivo-del-arandano-en-mexico-reto->

40. Staples RC. 2000. Research on the rust fungi during the twentieth century. Annual Review of Phytopathology 38: 49– 69.
41. SUDZUKI, F. 2002. Cultivo de frutales menores. 7a ed. Santiago. Facultad de Ciencias Agrarias, Veterinarias y Forestales, Universidad de Chile. Universitaria. 194 p.
42. Torres, P. (2015). Algunos Aspectos de la Fenología, el Crecimiento y la Producción de Dos Cultivares de Arándanos (*Vaccinium corymbosum* L. x *V. darowii*) Plantados en Guasca (Cundinamarca, Colombia).
43. Undurraga D., Pablo y Vargas S., Sigrid (2013) Manual del arándano [en línea]. Chillán: Boletín INIA - Instituto de Investigaciones Agropecuarias. no. 263. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.14001/7627> (Consultado: 21 noviembre 2022).
44. USHBC. (2020). IMPACT REPORT 2019-2020. U.S. Highbush Blueberry Council. Retrieved October 29, 2022, from <https://ushbc.blueberry.org/wp-content/uploads/sites/5/2021/02/USHBC-2019-2020-Impact-Report-Final.pdf>
45. University of Maine. (2007). 212-Botrytis Blight Control for Wild Blueberries - Cooperative Extension: Maine Wild Blueberries. University of Maine Cooperative Extension. Retrieved November 23, 2022, from <https://extension.umaine.edu/blueberries/factsheets/disease/212-botrytis-blight-control-for-wild-blueberries/>
46. Zhu, X. Q., & Xiao, C. L. (2015). Phylogenetic, Morphological, and Pathogenic Characterization of *Alternaria* Species Associated with Fruit Rot of Blueberry in California. *Phytopathology*, 105(12), 1555–1567. doi:10.1094/phyto-05-15-0122-r
47. Ista. (1999). Reglas Internacionales para Ensayos de Semillas. Ensayo topográfico al Tetrazolio. Secretaría de Estado de Agricultura y Ganadería. España.
48. Leslie S., Israeli E., Lighthart B., Crowe J., Crowe L. (1995). Trehalose and Sucrose Protect Both Membranes and Proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 3592-3597.

49. Berny J., Hennebert G. (1991). Viability and stability of yeast cells and filamentous fungus spores during freeze-drying: Effects of protectants and cooling rates. *Mycologia*, 86: 805-815.
50. MacKenzie A.P. (1977). Comparative studies on the freeze-drying survival of various bacteria: Gram type, suspending media and freezing rate. *Developmental Biology*, 36: 263-277.
- 51..(France,2019.)<https://www.intagri.com/articulos/fitosanidad/manejo-de-enfermedades-en-arandanos>