



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

MAESTRÍA EN PROTECCIÓN VEGETAL

**INCIDENCIA DE *Fusarium* spp. EN TRIGO
(*Triticum aestivum* L.) PROCEDENTE
DE LOS VALLES ALTOS DE MÉXICO.**

TESIS PROFESIONAL



COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

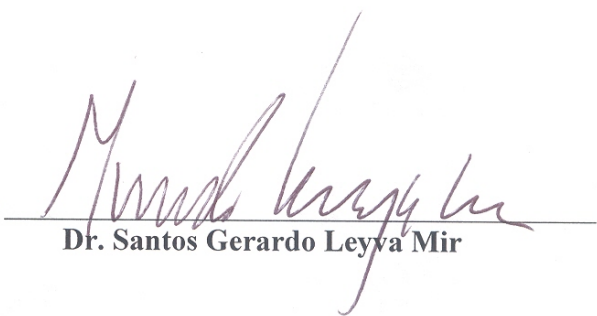
MAGDA KARINA MOEDANO MARIANO

INCIDENCIA DE *Fusarium* spp. EN TRIGO (*Triticum aestivum* L.) PROCEDENTE DE LOS VALLES ALTOS DE MÉXICO.

Tesis realizada por **Magda Karina Moedano Mariano** bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

DIRECTOR:


Dr. Santos Gerardo Leyva Mir

CO-DIRECTOR:


Dr. Héctor Eduardo Villaseñor Mir

ASESOR:


MC. Bertha Tlapal Bolaños

Chapingo, México. Julio de 2013

AGRADECIMIENTOS

Al Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado durante la realización de mis estudios de maestría.

Otra vez a la Universidad Autónoma Chapingo, le agradezco esta oportunidad. Al Programa de Maestría en Ciencias en Protección Vegetal del Departamento de Parasitología Agrícola por apoyarme en lograr esta meta en mis estudios profesionales.

Al Dr. Gerardo Santos Leyva Mir por dirigir el trabajo de investigación, por sus aportaciones y las facilidades otorgadas para la realización de la presente investigación.

Al Dr. Héctor Eduardo Villaseñor Mir por todo el apoyo, las sugerencias y el tiempo dedicado al trabajo de investigación.

A la MC. Bertha Tlapal Bolaños por su apoyo y el tiempo dedicado al presente trabajo de investigación, por sus valiosas observaciones, y sus consejos para superarme.

Al M.C. Camilo Juárez por apoyarme en la culminación de una parte importante de la investigación.

A la MC. Greta Hanako Rosas Saito por las facilidades otorgadas, el tiempo invertido en este trabajo de investigación.

A el MC. Mario Velasco Alvarado, a la MC. Carmen Gabriela Mendoza y al MC. Fco. Javier Sánchez por su valiosa amistad y el apoyo brindado en la realización de esta investigación.

A la Sra. Marianita y el Sr. Juanito por el apoyo brindado en el laboratorio de Micología del Departamento de Parasitología Agrícola.

Al fondo CONACYT-SAGARPA-COFUPRO, por apoyarme en la realización de esta investigación a través del proyecto No. 146788.

Gracias a todas aquellas personas que de alguna manera me apoyaron en la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

A las personas más importantes en mi vida, mi madre Emilia Mariano Maraño y mi padre Salustio Moedano Marin, que son mis motores para siempre seguir adelante, gracias por todo su cariño y apoyo. Los amo.

A mis queridos hermanos Heriberto Moedano, Martin Moedano y Luis Rey Moedano los amo, gracias porque siempre están conmigo y por su apoyo incondicional.

A mi hermana y amiga Ilse Gabriela Vázquez Martínez gracias, a pesar del tiempo y la distancia nunca te olvidas de mi.

A mi querido compañero de mi vida Mario Velasco, por todo su amor y apoyo incondicional. Te amo...

A mis sobrinos, Erick y Adamary Moedano...

A mis abuelitas, Cirenía Maraño y Juana Marin las amo mucho.

A mis abuelitos, Martin Mariano y Cleofas Moedano que a pesar que ya no están físicamente estén en mi corazón.

Mis tías y tíos... gracias por todo su cariño y apoyo, en especial a mi tío Mateo Mariano Maraño, que no está con nosotros pero siempre será un ejemplo para mí.

A la Familia Alvarado Narváez, por su cariño y amistad...

A mis queridos amigos Carmen Gabriela Mendoza y Fco. Javier Sánchez, gracias por su amistad y apoyo...

A mis primas y primos...

A mis compañeros de Protección Vegetal...

A todos mis amigos y amistades...

A la vida...

Con cariño y amor, Magda K. Moedano

DATOS BIOGRÁFICOS

Datos generales

Nombre: Magda Karina Moedano Mariano

Fecha de nacimiento: 24 de octubre de 1986.

Lugar de origen: Tlanchinol, Hidalgo.

Profesión: Ingeniero Agrónomo Especialista en Parasitología Agrícola.

Formación académica

Preparatoria: Preparatoria Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo (2002-2005).

Licenciatura: Departamento de parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo (2005-2009).

El tema del trabajo de investigación con el cual obtuvo el título de Ingeniero Agrónomo Especialista en Parasitología Agrícola fue “Etiología De La Pudrición Del Tubérculo De La Jícama (*Pachyrhizus erosus* (L.) Urban) En Tancitaro, Michoacán”.

Maestría en Ciencias: Programa en Protección Vegetal del Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo (2011-2013).

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
ÍNDICE DE CUADROS.....	X
RESUMEN.....	XI
ABSTRACT.....	XI
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	3
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
3.1. Enfermedades Fungosa del Trigo.....	4
3.2. Enfermedades ocasionadas por <i>Fusarium</i> spp.....	4
3.2.1. Micotoxinas de <i>Fusarium</i> spp.	5
3.3. <i>Gibberella zeae</i> Schw (<i>Fusarium graminearum</i> Schwabe).....	6
3.3.1. Importancia.....	6
3.3.2. Síntomas.....	6
3.3.3. Morfología.....	7
3.3.4. Biología y Epidemiología.....	8
3.3.5. Hospedantes.....	8
3.4. <i>Gibberella avenacea</i> Cook <i>Fusarium avenaceum</i> (Fries) Saccardo.....	9
3.4.1. Importancia.....	9
3.4.2. Síntomas.....	9
3.4.3. Morfología.....	9
3.4.4. Biología y Epidemiología.....	10
3.4.5. Hospedantes.....	10
3.5. <i>Monographella nivalis</i> Schaffn. <i>Fusarium nivale</i> Ces. Ex Berl. y Vogl.....	10
3.5.1. Importancia.....	10
3.5.2. Síntomas.....	11
3.5.3. Morfología.....	11

3.5.4. Biología y Epidemiología.....	11
3.5.5. Hospedantes.....	11
3.6. <i>Fusarium culmorum</i> (W.G. Smith) Saccardo.....	12
3.6.1. Importancia.....	12
3.6.2. Síntomas.....	12
3.6.3. Morfología.....	12
3.6.4. Biología y Epidemiología.....	12
3.6.5. Hospedantes.....	13
3.7. <i>Gibberella moniliformis</i> Wineland. <i>Fusarium verticillioides</i> (Saccardo) Nirenberg.....	13
3.7.1. Importancia.....	13
3.7.2. Síntomas.....	13
3.7.3. Morfología.....	14
3.7.4. Biología y Epidemiología.....	14
3.7.5. Hospedantes.....	14
3.8. <i>Haemanectria haematococca</i> Berkeley & Broome. <i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc.....	14
3.8.1. Importancia.....	14
3.8.2. Síntomas.....	15
3.8.3. Morfología.....	15
3.8.4. Biología y Epidemiología.....	16
3.8.5. Hospedantes.....	16
3.9. Microscopia Electrónica de Barrido.....	17
3.10. Identificación Molecular-Reacción en cadena Polimerasa (PCR).....	17
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
4.1. Localidades Primavera-Verano 2010 y 2011.....	19
4.1.1. Santa Lucia, Texcoco, Edo. México.....	19
4.1.2. Chapingo, Texcoco, Edo. México.....	19
4.1.3. Coatepec, Ixtapaluca, Edo. México.....	19
4.1.4. Juchitepec, Edo. México.....	19
4.1.5. Francisco Madero, Nanacamilpa, Tlaxcala.....	20
4.1.6. Nanacamilpa, Tlaxcala.....	20

4.1.7. Francisco Villa, Xaltocan, Tlaxcala.....	20
4.1.8. Terrenate, Tlaxcala.....	20
4.1.9. Texcal, Cuyoaco, Puebla.....	21
4.1.10. Tenango del Aire, Edo. México.....	21
4.1.11. Jilotepec, Edo. México.....	21
4.2. Variedades Utilizadas.....	21
4.2.1. Rebeca F2000.....	21
4.2.2. Tlaxcala F2000.....	22
4.3. Aislamiento de <i>Fusarium</i> spp.	22
4.3.1. Método Freezing Blotter.....	22
4.3.2. Aislamiento y purificación.....	23
4.4. Caracterización Morfológica.....	24
4.4.1. Microscopia electrónica de barrido.....	24
4.5. Caracterización Molecular.....	25
4.5.1. Protocolo de Extracción del ADN	26
4.5.2. Determinación de calidad de DNA.....	26
4.5.3. Amplificación del ADN por PCR.....	28
4.5.4. Purificación de ADN por Centrifugación.....	29
4.5.4.1. Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).....	29
4.6. Secuenciación.....	29
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
5.1 Incidencia de <i>Fusarium</i> spp.....	30
5.2. Caracterización Morfológica.....	32
5.2.1. <i>Fusarium avenaceum</i>	33
5.2.2. <i>Fusarium graminearum</i>	35
5.2.3. <i>Fusarium verticilloides</i>	37
5.2.4. <i>Fusarium nivale</i>	39
5.2.5. <i>Fusarium solani</i>	41
5.3. Caracterización Molecular.....	43
5.3.1. Secuenciación de <i>F. avenaceum</i> y <i>F. solani</i>	43
5.3.1.1. Secuencia de ADN de <i>F. avenaceum</i>	44

5.3.1.2. Secuencia de ADN de <i>F. solani</i>	44
5.4. Especies de <i>Fusarium</i> spp. con riesgo colateral.....	45
VI. CONCLUSIONES.....	51
VII. LITERATURA CITADA.....	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. a) Granos de trigo en cajas transparentes; b) esporulación de los hongos; c) aislamiento del hongo en nuevas cajas de PDA; d) conservación del hongo en tubos con PDA y aceite.....	23
Figura 2. a) Muestras en glutaraldehído 2.5 % en amortiguador de fosfatos Sorensen's; b) recipientes donde se secaron las muestras; c) colocación sobre portamuestras usando una cinta de doble adhesión de carbón; d) recubrimiento con oro durante 4 minutos en una ionizadora (Ion Sputter JFC-1100, Jeol, Fine Coat); e) muestras con recubrimiento de oro; f) microscopio Electrónico de Barrido (JEOL JSM 6390).....	25
Figura 3. a) Material para extracción de ADN; b) micelio del hongo colocado en tubos eppendorf para su extracción de AND; c) macerado hongo para su extracción de DNA; d) corrida de electroforesis en gel de agarosa al 1%; e) revelador de geles Gel doc-it ® Imagen system; f) amplificación del ADN mediante PCR termociclador Biorad C-1000 ® Termal cycler.....	27
Figura 4. Proceso de amplificación del ADN en el termociclador.....	28
Figura 5. Frecuencia de hongos encontrados en las variedades de trigo Rebeca F2000 y Tlaxcala F2000 durante el ciclo P/V 2010.....	31
Figura 6. Frecuencia de hongos encontrados en las variedades de trigo Rebeca F2000 y Tlaxcala F2000 durante el ciclo P/V 2011.....	31
Figura 7. a) Síntomas de granos de trigo; b) crecimiento de la colonia de <i>F. aveneaceum</i> los granos de trigo; c) crecimiento de la colonia en PDA, micelio algodonoso; d) superficie de la colonia en PDA; e) micelio y macroconidios; f) macroconidios rectos.....	33

Figura 8. a) Aislado de <i>F. avenaceum</i> medio de cultivo AA; b y c) macroconidios de 4 y 5 septos adheridos al micelio; d) microconidio de 2 septos; e) monofialide; f) clamidosporas intercalares, y en cadena.....	34
Figura 9. a) Síntomas de granos de trigo; b) desarrollo de la colonia de <i>F. graminearum</i> de granos de trigo; c) crecimiento del micelio aéreo de la colonia en PDA, micelio algodonoso rosáceo-violeta; d) superficie de la colonia en PDA; e) macroconidios, célula basal en forma de pie; f) macroconidios de varias formas y de 5-6 septos.....	35
Figura 10. a) Macroconidio de <i>F. graminearum</i> , con célula basal en forma de pie; b, c y d) macroconidios de cuatro y cinco septos ligeramente curvos, célula apical en punta y célula basal en forma de pie.....	36
Figura 11. a) Síntomas en granos de trigo; b) crecimiento de la colonia de <i>F. verticilloides</i> en los granos de trigo; c) crecimiento aéreo de la colonia en PDA, micelio algodonoso blanquesino a rosáceo; d) superficie de la colonia en PDA, color violeta; e y f) microconidios.....	37
Figura 12. a y b) Macroconidios y microconidios de <i>F. verticilloides</i> ; c) microconidios unicelulares; d) microconidios adheridos al micelio; e) microconidios a partir de monifialides en forma de “V”; f) monofialides en forma de “V”.....	38
Figura 13. a) Síntomas de granos de trigo; b) crecimiento de la colonia de <i>F. nivale</i> en los granos de trigo; c) crecimiento de la colonia en PDA, micelio algodonoso blanquecino-rosado; d) superficie de la colonia en PDA, de color rosáceo a violeta; e y f) conidios.....	39
Figura 14. a, b, c y d) Conidios de <i>F. nivale</i> , cortos y curvos, se adelgazan en sus extremos, de diversos tamaños.	40
Figura 15. a) Síntomas de granos de trigo; b) crecimiento de la colonia de <i>F. solani</i> ; c) crecimiento de la colonia en PDA, micelio algodonoso; d) superficie de la colonia en PDA; e) microconidios con dos septos y clamidosporas; f) clamidosporas en cadenas cortas.....	41

Figura 16. a) Microconidios de <i>F.solani</i> ; b) microconidios de dos y tres septos; c) monofialides; d) clamidospora terminales en las ramas laterales de las hifas; e) clamidosporas en cadena; y f) clamidospora en parejas.....	42
Figura 17. a) Electroforesis de extracción de AND (-) negativo, (+) positivo, (F13) DNA muestra <i>F. avenaceum</i> , (F15) DNA muestra <i>F. solani</i> ; b) Electroforesis de producto de PCR (M.M) marcador molecular.....	43
Figura 18. Frecuencia de especies de <i>Fusarium</i> aislados de la variedad de trigo Rebeca F2000 del ciclo P/V 2010 de los Valles Altos de México.....	45
Figura 19. Frecuencia de especies de <i>Fusarium</i> aislados de la variedad de trigo Tlaxcala F2000 del ciclo P/V 2010 de los Valles Altos de México.....	46
Figura 20. Frecuencia de especies de <i>Fusarium</i> aislados de la variedad de trigo Rebeca F2000 del ciclo P/V 2011 de los Valles Altos de México.....	47
Figura 21. Frecuencia de especies de <i>Fusarium</i> aislados de la variedad de trigo Tlaxcala F2000 del ciclo P/V 2011 de los Valles Altos de México.....	48

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Cuadro 1. Incidencia de <i>Fusarium</i> spp. en las localidades de los Valles altos de México durante los ciclos de producción primavera-verano de 2010 y 2011, así como las condiciones de precipitación y temperaturas dominantes para las regiones de estudio.....	30
Cuadro 2. Características de las colonias de aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. desarrolladas en medio de cultivo papa dextrosa agar.....	32
Cuadro 3. Dimensiones de macroconidios, microconidios y clamidosporas, sobre medio de cultivo agua agar.....	32

INCIDENCIA DE *Fusarium* spp. En Trigo (*Triticum aestivum* L.) PROCEDENTE DE LOS VALLES ALTOS DE MÉXICO.

INCIDENCE OF *Fusarium* spp. IN WHEAT (*Triticum aestivum* L.) FROM THE HIGH LANDS OF MEXICO

M. K. Moedano-Mariano¹ y S. G. Leyva-Mir²

RESUMEN

La fusariosis de la espiga de los cereales de grano pequeño, el tizón de plántulas y pudrición del pie de los cereales son enfermedades importantes en el mundo, ocasiona pérdidas severas en rendimiento de grano y merman la calidad industrial, los granos enfermos pueden contener micotoxinas dañinas para el ser humano y los animales. Se sabe que el agente causal es *Fusarium*, pero hace falta conocer que especies atacan el grano de trigo en México; por lo que el objetivo del trabajo fue, cuantificar la incidencia de *Fusarium* spp. entre las zonas productoras de los Valles Altos de México, utilizando las variedades Rebeca F2000 y Tlaxcala F2000, se aisló a *Fusarium* spp. de semilla de trigo de los ciclos Primavera-Verano (P/V) 2010 y 2011 de un muestreo al azar y se identificaron las especies a través de técnicas moleculares y microscopía electrónica de barrido. Los resultados permitieron identificar a cinco especies, la más frecuente fue *F. avenaceum* 12% para 2010 y 14.6% para 2011, *F. graminearum* 7.8% y 8.9% respectivamente, *F. verticillioides* 6.8% y 2.9%, *F. solani* 0.3% y 2.1% y *F. nivale* solo se presentó en 2010 1%. La variedad más susceptible a *Fusarium* spp. fue Rebeca F2000. Las técnicas moleculares (PCR) confirmaron las especies de *F. avenaceum* y *F. solani* con base en la banda de 556 pb y 561 pb respectivamente y la amplificación de la región interna del genoma ITS (ITS4 e ITS5). La presencia y diseminación de *Fusarium* spp. está relacionada con las condiciones ambientales y la condición genética del material vegetal; lo cual puede estar relacionado con los resultados de este trabajo.

Palabras clave: *Fusarium* spp., micotoxinas, calidad, rendimiento.

ABSTRACT

Fusarium head blight of small grain cereals, seedling blight and foot rot of cereals are important diseases in the world that cause stringent losses of grain yield and diminish its industrial quality, kernels infected may contain mycotoxins that are harmful to humans and animals. It is known that the causal agent of these diseases is *Fusarium*, but it is still unknown which species attack the kernel of wheat in Mexico, for that reason, the objective of this research was to quantify the incidence of *Fusarium* spp. between the production areas of the highlands of Mexico; therefore, wheat seeds of the varieties Rebeca F2000 and F2000 Tlaxcala that were harvested during the Spring-Summer cycles (P / V) 2010 and 2011 were randomly sampled, then *Fusarium* spp. was isolated, likewise the species of *Fusarium* were identified through molecular techniques and scanning electron microscopy (SEM). The results allowed to identify five species, in 2010 and 2011, respectively, the most frequent species were *F. avenaceum* 12% and 14.6%, *F. graminearum* 7.8% and 8.9%, *F. verticillioides* 6.8% and 2.9%, *F. solani* 0.3% and 2.1%) and *F. nivale* that only occurred in 2010 1%. The most susceptible variety to *Fusarium* spp. was Rebeca F2000. Through molecular techniques (PCR), based on the band of 556 bp and 561 bp (respectively) and the amplification of the internal region of the genome ITS (ITS-4 and ITS-5) the species of *F. avenaceum* and *F. solani* were confirmed. The presence and dissemination of *Fusarium* spp. is related to the environmental conditions and to the genetic condition of the plant material, which may be related to the results of this work.

Keywords: *Fusarium* spp., mycotoxins, quality, yield.

¹ Tesista

² Director

I. INTRODUCCIÓN

El trigo es un cultivo universal y de los pocos que se han dispersado por todo el mundo. Perteneció al género *Triticum* que se originó en las tierras fértiles de la Mesopotamia. Se originó cuando dos especies diploides se cruzaron de forma natural para dar origen a una especie tetraploide, en la actualidad incluye al trigo duro (*Triticum turgidum*). El trigo tetraploide se cruzó con un zacate diploide (*T. tauschii*), considerado como maleza en muchas áreas trigueras, que dio origen al trigo harinero hexaploide (*Triticum aestivum* L.) (Villasenor y Espitia, 2000).

Todas las especies de trigo pertenecen al género *Triticum* de la tribu *Triticeae* (*Hordeae*) de la subfamilia *Festucoideae* y la familia *Gramineae*. El trigo de igual forma que otras especies de zacates presentan una estructura básica de raíz, tallos, hojas e inflorescencias. Las flores se encuentran protegidas por escamas o brácteas y agrupadas en estructuras muy características conocidas como espiguillas. En el caso específico del trigo, las espiguillas se encuentran directamente insertadas a un tallo central conocido como raquis que forma la cabeza o espiga (Villasenor y Espitia, 2000). El cultivo constituye una fuente de alimento nutritiva, conveniente y económica. Proporciona cerca del 20 % de los requerimientos calóricos alimentarios del mundo y constituye el producto principal para casi el 40 % de la población mundial. El promedio mundial en el consumo de trigo para el 2008 fue de 95 kg, cifra que confirma que este grano es el segundo de mayor consumo en el mundo, antecedido solo por el maíz. La participación de México en el consumo internacional de trigo representó para este año el 1 % del total mundial, ubicándose en el lugar 19 en consumo; así mismo, a nivel per cápita, los mexicanos consumieron en promedio 56 kg por habitante, cifras que muestran que aunque no es uno de los principales consumidores a nivel internacional, el grano sí es de especial importancia en el consumo (Caballero, 2008). En México, el trigo harinero se utiliza en la elaboración de panes, tortilla, galletas y repostería (Peña *et al.*, 2008).

T. aestivum L. es una especie de gran importancia debido a que tiene un rango amplio de adaptación y un gran consumo en muchos países. En México es uno de los cereales de mayor relevancia, por los niveles de producción alcanzados; constituye una fuente importante de ingresos, debido a que genera empleos durante su proceso de producción y comercialización. En el mundo se siembra en 122 países. La producción mundial es superior a los 650 millones de toneladas. Los cinco

principales países productores de trigo en el mundo son: China, India, E.U.A., Rusia y Francia (FAOSTAT, 2011; Peña *et al.*, 2006; Pingali, 1999).

En nuestro país se cultiva en más de 20 estados. Sin embargo, el 60 % de la producción se concentra en el noroeste. En el ciclo otoño-invierno (O-I) bajo condiciones de riego, representa aproximadamente el 60 % de total nacional y agrupa a los estados de Baja California, Sonora y Sinaloa, Guanajuato, Jalisco y Michoacán (SIAP, 2012; Peña *et al.*, 2006).

El resto se produce en regiones del centro y el altiplano, en el ciclo Primavera-Verano (P-V) en condiciones de temporal. La producción de temporal es importante porque se localiza cerca de la zona de proceso de molienda y panificación industrial, hecho que permite reducir costos de transportación, que son elevados cuando el trigo se traslada de sitios lejanos (Villasenor y Espitia, 2000).

La producción de trigo para el ciclo P-V del 2012 fue de 184 mil toneladas obtenidas a partir de una superficie de 86 mil hectáreas y con rendimientos de 2.17 toneladas por hectárea. Esta producción se concentra en 28 municipios que producen 72 % del trigo nacional del ciclo P-V. Los principales estados productores son Tlaxcala, Estado de México, Oaxaca, Guanajuato, Jalisco, Zacatecas, Puebla, Durango, Michoacán, Morelos e Hidalgo (SIAP, 2011).

Entre las limitantes de la producción del trigo de temporal se encuentran las enfermedades foliares y del grano, las cuales son muy variables, pues dependen de factores como la condición genética de las variedades cultivadas, estado de desarrollo de la planta, temperatura, humedad ambiental, prácticas culturales y los cambios de clima, generalmente de frío a húmedo en condiciones de temporal en las partes altas y lluviosas de los Valles Altos de México (México, Puebla, Tlaxcala e Hidalgo) y Michoacán y Jalisco. El complejo de enfermedades ocasiona pérdidas severas en rendimiento de grano y merma la calidad industrial en variedades susceptibles (Prandini *et al.*, 2009; Leyva y González, 2000; Wiese, 1987).

La semilla es el principal insumo para la producción de cultivos. Cuando la semilla se utiliza en la siembra, los patógenos transmitidos por vía pueden causar enfermedades o la muerte de las plantas, lo cual provoca pérdidas. Si las semillas se utilizan como fuente de alimentos, los organismos transmitidos pueden producir cambios químicos, deterioro importante en el contenido de la semilla,

o liberación de toxinas, con efectos potenciales en los seres humanos y el ganado, lo cual provoca desperdicio de alimentos o hambruna (Prandini *et al.* 2009; Chiarappa y Gambogi, 1986).

Las zonas trigueras de temporal de México se han reportado cuatro especies de *Fusarium*: *F. graminearum*, *F. avenaceum*, *F. nivale*, *F. equiseti* (Gilchrist *et al.*, 2005; Ireta M., 1994). Sin embargo, en diferentes estudios realizados para identificar el organismo causal, se han aislado e identificado hasta 18 especies de *Fusarium*. El género *Fusarium* es uno de los hongos más abundantes en la producción de micotoxinas, especialmente cuando ataca cereales como el maíz, trigo, arroz y sorgo (Kvas, *et al.* 2009; Goswami, *et al.* 2005; Walg, 1988). Aunque se sabe que el agente causal es *Fusarium*, hace falta conocer qué especies atacan el grano de trigo, lo que lleva a plantear el presente trabajo con los siguientes objetivos:

II. OBJETIVOS

1. Cuantificar la incidencia de *Fusarium* spp. en las zonas productoras de la región centro en las variedades Rebeca F2000 y Tlaxcala.
2. Aislar a *Fusarium* spp. de semilla de trigo de zonas de los Valles Altos de México en los ciclos Primavera-Verano 2010 y 2011.
3. Identificar especies de *Fusarium* spp. a través de técnicas moleculares y microscopia electrónica de barrido.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3. 1. Enfermedades Fungosas del Trigo

Los hongos se distinguen de las plantas porque no tienen clorofila y, por consiguiente, carecen de la capacidad de fotosíntesis. En lugar de elaborar su propio alimento, los hongos absorben nutrientes del tejido muerto o vivo de su hospedante. Los hongos se propagan en diversas formas: semillas, suelo, viento, agua (lluvia, agua de riego), insectos, animales y el hombre. La infección por hongos patógenos depende de varios factores, se requieren de la presencia de agua libre en la superficie de la planta hospedante, sensibilidad de la misma, densidad de inóculo y temperatura ambiente, además de otros factores del medio. Algunos hongos atacan sólo a una especie hospedante, pero otros atacan a amplio rango. Los síntomas y el desarrollo de la enfermedad dependen de la interacción entre el parásito y el hospedante; y pueden ser similares o distintos según los hongos involucrados y, en consecuencia, una identificación categórica de éstos debe basarse en su morfología (Agrios, 2002; Presscot *et al.*, 1986).

3.2. Enfermedades ocasionadas por *Fusarium* spp.

La roña o tizón de la espiga del trigo fue reportada por primera vez en Inglaterra alrededor de 1884; es importante en áreas cálidas y húmedas (Dubin *et al.*, 1996). Las dos enfermedades comunes de los cereales causadas por *Fusarium* spp. son pudriciones de la raíz y roña o fusariosis de la espiga. La mayoría de las especies del género son hongos que habitan en el suelo y pueden ser parásitos facultativos. La roña se reconoce fácilmente por la aparición de una o más espiguillas prematuras afectadas con tizón después de la floración (Fernández y Chen, 2005). Las espiguillas infectadas presentan color paja pálido, en contraste con el verde normal de las sanas. A medida que se desarrolla el cultivo de trigo, se acumulan masas de conidios de color rosado pálido a naranja en la base de las espiguillas o a lo largo de los bordes de las glumas y lemas. Los granos infectados están chupados y no son viables; además que pueden contener micotoxinas nocivas para los humanos y animales; causar caída y marchitez de plántulas, pudrición de la corona, tizón de los nudos y de los tallos, y pudrición del grano (Lawrence y Jeffrey, 2007, Xu *et al.*, 2007; Goswami y Kistler, 2005; Moreno, 1988; Zyllinsky, 1984).

Las especies del género *Fusarium* producen dos tipos de conidios que difieren en tamaño; algunas especies producen esporas pequeñas llamadas microconidios, y en otras estas estructuras están ausentes. Los microconidios son pequeños y carecen de características útiles para el diagnóstico; sin embargo, la presencia o ausencia de estos puede ser útil para la identificación de las especies. Las esporas grandes, llamadas macroconidios, son producidas por todas las especies y tienen características morfológicas que son útiles para su identificación (Zyllinsky, 1984). La fusariosis de la espiga se asocia a 18 organismos causales, que se producen en los cereales del mundo. Las especies son *Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*), *F. culmorum*, *F. avenaceum* (*G. avenacea*), *F. poae* y *F. nivale* (*Monographella nivalis*) (Gilchrist *et al.*, 2005; Saharan *et al.*, 2004; Parry *et al.*, 1995).

3.2.1. Micotoxinas de *Fusarium*

Las micotoxinas son un grupo heterogéneo de sustancias químicas que tienen efectos negativos agudos y/o crónicos sobre la salud de los animales y seres humanos. Pueden afectar numerosos órganos y sistemas, con particular importancia el hígado, los riñones y el sistema nervioso, endocrino e inmunitario (Whitlow y Hagler, 2005). Varias de ellas están clasificadas como carcinógenas o posibles carcinógenas para los seres humanos por el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer, de modo que su toxicidad crónica en dosis bajas suscita preocupación mayor que la toxicidad aguda, ya que la exposición a las mismas es amplia y su poder carcinógeno elevado. Cualquier cosecha almacenada por varios días es un blanco para el crecimiento de estos hongos y la formación de toxinas, las cuales pueden desarrollarse tanto en áreas tropicales como templadas (González *et al.*, 2005; Prandini *et al.*, 2009).

Los géneros de hongos productores de micotoxinas importantes son *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*. Muchas especies de ellos producen micotoxinas, los mohos pueden crecer y las micotoxinas producirse antes de la cosecha, el transporte, el procesamiento o el almacenamiento (Prandini *et al.*, 2009). Se han reportado cerca de 300 micotoxinas diferentes, pero sólo alrededor de 20 se encuentran en los alimentos o en concentraciones que pueden considerarse peligrosas para los animales y personas que consuman estos alimentos. Las micotoxinas más conocidas que tienen relevancia desde el punto de vista de la salud son aflatoxinas, ocratoxinas, fumonisinas, patulinas, tricotecenos (nivalenol, deoxynivalenol y toxina T-2) y zearalenona (González *et al.*, 2005).

El crecimiento de hongos y la producción de micotoxinas están relacionados con estrés de la planta provocada por factores ambientales como: condiciones climáticas extremas, daños por insectos, condiciones inadecuadas de almacenamiento y la fertilización incorrectas, los cuales predisponen a las plantas a la contaminación por micotoxinas en el campo. Especies de *Fusarium* infestan el trigo durante el período de floración. Además de las pérdidas de rendimiento, estos hongos también pueden sintetizar componentes tóxicos (micotoxinas) en condiciones ambientales adecuadas, poniendo así en peligro la salud animal y humana (Prandini *et al.*, 2009; Xuet *et al.*, 2007; Whitlow y Hagler, 2005; Ireta y Gilchrist, 1994); las toxinas reportadas son tricotecenos incluyendo deoxinivalenol y el nivalenol, así como la zearalenona y moniliformina, y presentan un rango de toxicidad para los animales (Chandra *et al.*, 2011; Desjardin, 2007; Xu *et al.*, 2007; Leslie y Summerell, 2006; Makoto, *et al.*, 2006; Nicholson *et al.*, 2004).

3.3. *Gibberella zeae* Schw (*Fusarium graminearum* Schwabe)

3.3.1. Importancia

La fusariosis de la espiga del trigo (*F. graminearum* Schwabe) fue descrita por primera vez en 1891 por Arthur en los Estados Unidos; posteriormente en 1902 se reportó en Japón. En México, se observó en 1977 en el área del Altiplano de Jalisco. En la actualidad, se presenta en las regiones cálido-húmedas del mundo, como el Norte-Centro de Europa, Asia, y principalmente en China y Japón, donde la enfermedad se reporta como endémica (Ireta y Gilchrist, 1994); en 2010 se reportó en granos de trigo en Australia Occidental (Wright *et al.*, 2010).

Las aéreas productoras de trigo de temporal en México donde la incidencia de la roña es muy alta son la Sierra Tarasca en Michoacán, la región de los Altos y la Sierra del Tigre y Tapalpa en Jalisco, el Valle de Toluca y Jicotepec, Estado de México, principalmente, con incidencias que van de un 10 al 90%, según sea la susceptibilidad de la variedad y de las condiciones climatológicas (Ireta y Gilchrist, 1994).

3.3.2. Síntomas

El lugar de ataque de *F. graminearum* son las espigas del trigo, particularmente los órganos florales, lo cual reduce la formación y llenado de granos. El inóculo principal está constituido por

los macroconidios o ascoporas que son diseminadas por el viento y la lluvia. La espiguilla infectada pierde clorofila rápidamente y se torna descolorida. Posteriormente toma un color rosa o salmón, especialmente en la base y bordes de las glumas. Si la humedad se mantiene alta, la espiguilla enferma es invadida por hongos saprofitos que le dan una coloración oscura o negra. En el campo las espiguillas infestadas por la fusariosis se encuentran en el tercio medio de la espiga, debido que ahí es donde se inicia la antesis, si las condiciones ambientales son favorables, la infección avanza hacia las espiguillas adyacentes y, en algunos casos, puede llegar a toda la espiga incluyendo el raquis o pedúnculo de la misma (Ireta y Gilchrist, 1994).

La roña de la espiga provoca que los granos puedan quedar deshidratados y de peso bajo, además de ser cubiertos por el micelio del hongo y toman una apariencia de masa algodonosa de color rosa, lo que reduce el rendimiento, la calidad y el valor alimenticio del grano (Prescott *et al.*, 1986; Zillinsky, 1984). Además del daño directo a la planta, los aislamientos de *F. graminearum* pueden producir metabolitos secundarios como las zearalenonas, nivalenol y deoxinivalenol y fumonisinas, que al ser ingeridas por humanos y animales en alimentos contaminados, les provocan efectos tóxicos (Magliano y Kikot, 2010; Nicholson *et al.*, 2004; Marasas *et al.*, 1984). Estudios realizados por Yoshida y Nakajima (2010) reportan que los niveles altos de deoxinivalenol y nivalenol pueden producirse 20 días después de la antesis, incluso por la infección temprana.

3.3.3. Morfología

Los macroconidios generalmente miden de 25 a 50 μm y el número de septos va de 5 a 6, y suelen ser muy diferentes. Se producen en masas de color naranja o amarillo, en la base de las espiguillas o en las orillas de las glumas o lemas; éstos son hialinos, rectos o moderadamente curvada con la superficie ventral recta y el lado dorsal suavemente arqueado y con frecuencia tienen una célula apical alargada que se curva y adelgaza abruptamente hacia un punto y la morfología de la célula basal bien desarrollada la forma del pie. Los esporodoquios de color naranja pálido, pero a menudo raros o difíciles de encontrar. Los macroconidios en el esporodoquio suelen ser uniformes en forma y tamaño. Cuando se presentan periodos prolongados de tiempo húmedo y caliente durante la cosecha, con frecuencia, se desarrollan peritecios superficiales sobre las espigas y paja infestadas (Leslie y Summerell, 2006; Zillinsky, 1984).

3.3.4. Biología y Epidemiología

Los residuos de cultivo juegan un papel importante en la sobrevivencia de *F. graminearum*, pues éste perdura en forma de micelio o peritecios inmaduros en las espiguillas infestadas del trigo o restos de mazorcas de maíz, también sobre los rastrojo de maíz y trigo. Otra importante fuente de inóculo son los granos de trigo infestados que quedan en el suelo después de la cosecha. Las prácticas culturales son determinantes en la sobrevivencia del inóculo primario, ya que al incorporar el rastrojo se logra disminuir la viabilidad de este y, por consiguiente reducirlo (Ireta y Gilchrist, 1994).

Las condiciones apropiadas para la producción del inóculo son humedad relativa elevada y una temperatura ligeramente cálida. La temperatura requerida para la formación de macroconidios es de 16°C a 36°C, con un óptimo de 32°C. La formación de peritecios en campo se observa de cuatro a cinco semanas después de las primeras infecciones, siempre y cuando las condiciones ambientales se mantengan favorables. Se ha observado que las ascosporas se pueden producir con temperaturas de 13°C a 33°C, con un óptimo de 25 a 28°C. La luz ultravioleta juega un papel importante en la producción de peritecios y ascosporas (Ireta y Gilchrist, 1994). El teleomorfo es *Gibberella zae*, este hongo es transmitido por semilla, pasa el invierno como micelio en residuos infestados y como peritecios en avena, cebada, maíz, trigo y otros residuos enfermos del ciclo anterior, las ascosporas producidas en peritecios, se difunden por el viento a las plantas hospedantes, los conidios de *Fusarium* spp. son producidos a partir de micelio y también se difunden por el viento (Desjardins, 2006; Leslie y Summerell, 2006; Nyvall, 1999).

3.3.5. Hospedantes

Los hospedantes comunes de *F. graminearum*, además del trigo, son cebada, avena, centeno, maíz, alfalfa y el triticale. También se reportan que algunas gramíneas silvestres, como *Brachiaria plantagia* (L.K.) Hitch., *Pennisetum purpureum* Chumach., *Pennisetum clandestinum* Chiov., *Digiaria sanguinalis* Scap., *Paspalum* spp. *Andropogon bicornis* y *Eryathus* sp., son hospedantes secundarios (Leslie y Summerell, 2006; Ireta y Gilchrist, 1994).

3.4. *Gibberella avenacea* Cook (*Fusarium avenaceum* (Fries) Saccardo)

3.4.1. Importancia

Esta especie causa pudriciones de la raíz, corona y la roña. Se encuentra distribuida en una gran diversidad de temperaturas (Zillinsky, 1984), y regiones templadas y en menor grado en zonas tropicales (Warham *et al.*, 1998). Es más frecuente en climas fríos y húmedos (Wiese, 1987).

Producen micotoxinas dañinas a los humanos y animales, pueden permanecer en los granos almacenados varios años. El estado teleomorfo *Gibberella avenacea* Cook, es una de las especies importantes en el mundo, esta especie puede producir cantidades significativas de metabolitos tóxicos incluyendo moniliformina y enniatins (Bottalico, 1998.). Estudios realizados por Logrieco *et al.*, (2002) reportaron la producción natural de beauvericina y enniatin.

3.4.2. Síntomas

Las infestaciones son frecuentes y graves en la antesis; los síntomas de “atizonamiento” se dan en los tres días posteriores, cuando las temperaturas varían entre 25 a 30°C y hay humedad relativa constante (Parry *et al.*, 1995; Wiese, 1987).

3.4.3. Morfología

La tasa de crecimiento varía de lento a rápido. *Fusarium avenaceum* forma micelio abundante que varía de color blanco a amarillo claro a rosa grisáceo. Cuando aparecen tonalidades naranja pálido a marrón es indicio de que ya se formaron los esporodoquios en una masa de esporas en la región central. El pigmento formado en el agar es de color rosa grisáceo a borgoña, pero puede aparecer de color marrón debido a la luz reflejada de la masa de esporas en el centro, la morfología de la colonia es variable (Leslie y Summerell, 2006; Wiese, 1987).

Los macroconidios son largos, delgados y ligeramente curvos de manera uniforme en toda su longitud y con una célula apical alargada acabada en punta y una célula basal, dentada, aunque algunas cepas pueden tener células basales en forma de pie (Leslie y Summerell, 2006; Wiese, 1987; Zillinsky, 1984). Miden de 50 a 80µm, el número de septos generalmente es de 5 a 6, pero se pueden observar de 3 y 4 (Leslie y Summerell, 2006). Ocasionalmente se puede encontrar el estado teleomorfo en las plantas infestadas (Zillinsky, 1984).

Microconidios de forma fusoides con 1 a 2 septos, pueden variar en tamaño y se presentan generalmente solos. Las células conidiógenas pueden presentarse en monofialides o polifialides (Leslie y Summerell, 2006).

3.4.4. Biología y epidemiología

El desarrollo de esta enfermedad se favorece por condiciones cálidas y húmedas durante y después del espigamiento (Zyllinsky, 1984). Los hongos se multiplican en el cereal infestado y en los residuos de pasto en el suelo y contaminan la semilla (Wiese, 1987). Las ascosporas se producen al final del cultivo por lo que no contribuyen en el inóculo secundario, persistiendo en los residuos de cosecha (Wiese, 1987). El inóculo de los residuos de cosecha y el que proviene del suelo pueden provocar la marchitez de las plántulas y la pudrición del tallo. Las infecciones pueden causar lesiones en la base del tallo, que afectan el funcionamiento vascular y provocar retraso en el crecimiento (Nelson *et al.*, 1981), las cuales pueden actuar como una fuente de inóculo para la infección de las espigas al momento de la floración a través de la dispersión de esporas por salpicaduras, lo que causa el tizón de la espigas, cuando es grave provoca pérdidas considerables del rendimiento y calidad de grano (Leslie y Summerell, 2006; Parry *et al.*, 1995).

3.4.5. Hospedantes

Es cosmopolita, con respecto a la tolerancia climática, así como los hospedantes, abarca las legumbres, coníferas y claveles (Booth, 1971). Se encuentra con frecuencia en el grano, tallo y rastrojo de varios cereales, incluido trigo y cebada (Leslie y Summerell, 2006).

3.5. *Monographella nivalis* Schaffn. (*Fusarium nivale* Ces. Ex Berl. y Vogl.)

3.5.1. Importancia

Cuando la enfermedad es grave, puede provocar la defoliación completa, lo que deriva en un desarrollo de granos escaso, provocando arrugamiento de los mismos y bajo peso hectolítico (Santoyo y Quiroz, 2004; Presscot *et al.*, 1986). Es un patógeno importante en las zonas templadas y frías (Leyva y González, 2000; Zyllinsky, 1984).

3.5.2. Síntomas

Las manchas causadas por este microorganismo se vuelven visibles en las hojas aproximadamente a fines de la etapa de formación de nudos e inicio del “embuchamiento” (Presscot *et al.*, 1986). Las lesiones jóvenes se presentan como áreas ovales o de forma irregular de color verde grisáceo moteado; crecen rápidamente y se transforman en manchas ovales, de color café grisáceo con áreas centrales grises, localizadas generalmente donde se curva la hoja. En las lesiones viejas el tejido foliar, se torna quebradizo y tiende a agrietarse o a doblarse (Zyllinsky, 1984). El hongo también puede causar tizón de las plántulas, pudrición del pie, roña de la espiga y en los cereales de invierno, moho níveo rosado (Presscot *et al.*, 1986; Parry, 1990).

3.5.3. Morfología

De acuerdo con Warham *et al.* (1998), es una especie de identificación fácil que parasita los cereales; los conidios son cortos, curvos, se adelgazan en sus extremos y las células pie no están bien marcadas; conidios hialinos, cortos, curvos, con un ápice puntiagudo y achatado y base cuneiforme; tienen de uno a tres septas y miden de 10-30 x 2-5 μm pero con frecuencia presentan una septa. Los peritecios se desarrollan rápido en las hojas y las vainas foliares infestadas durante o después de la madurez, presentan ascosporas pequeñas, hialinas, elípticas, curvadas irregularmente, tienen de una a tres septas y miden de 10-18 μm x 3.5 μm (Zyllinsky, 1984). Su teleomorfo es *Monographella nivalis* (Schaffn.) E. Müller (Warham *et al.*, 1998).

3.5.4. Biología y Epidemiología

El hongo en verano se dispersa como inóculo primario o secundario en residuos infestados, las esporas se producen en restos de cultivos sobre la superficie del suelo o cerca del mismo y son transportadas a las hojas por el viento o las salpicaduras de lluvia. El tiempo fresco y húmedo favorece el desarrollo de la enfermedad (Presscot *et al.*, 1986; Zyllinsky, 1984).

3.5.5. Hospedantes

En general, la enfermedad afecta más al trigo cristalino y triticale que al trigo harinero o el centeno; la avena y la cebada parecen ser inmunes (Santoyo y Quiroz, 2004).

3.6. *Fusarium culmorum* (W.G. Smith) Saccardo.

3.6.1. Importancia

Es un patógeno que reporta pérdidas considerables de rendimiento en las zonas húmedas. Las espigas infestadas son portadoras de micotoxinas en el grano cosechado. La infestación de las espigas se produce durante la floración y se favorece por el clima húmedo y temperaturas cálidas. Las micotoxinas producidas por *F. culmorum* son deoxinivalenol, el nivalenol zearalenona y fusarenone, que son un peligro potencial para la salud de los seres humanos y los animales (Chandra *et al.*, 2011; Wagacha y Muthomi, 2007). *F. culmorum* se asocia a una dermatitis en seres humanos (Snijders *et al.*, 1996).

3.6.2. Síntomas

Produce lesiones de color café a marrón rojizo, se pueden observar en la base de la hoja en las plántulas o en el tallo, justo debajo de la superficie del suelo. Algunas plantas pueden tener estos puntos en el mesocotilo cerca de la semilla (Hajieghrari, 2009; Nyvall, 1999).

3.6.3. Morfología

La especie produce macroconidios cortos, gruesos o robustos, hialinos, curvos uniformemente, y puntiagudos en su ápice (Wiese, 1987); generalmente tienen de tres a cinco septas y miden de 30-60 μm x 4-7 μm , no se producen microconidios ni peritecios, las clamidosporas se desarrollan eficientemente en el suelo y funcionan como mecanismo de supervivencia (Zillinsky, 1984). El micelio es generalmente de color blanco, pero a menudo de color amarillo a marrón, crece rápidamente produciendo abundantes esporodoquios en una gran masa de esporas central (1 a 2 cm de diámetro), que inicialmente es de color naranja pálido, pero se forma marrón oscuro (Wagacha y Muthomi, 2007; Leslie y Summerell, 2006).

3.6.4. Biología y Epidemiología

Esta especie sobrevive a condiciones extremas, tanto de sequía como de heladas que *F. graminearum* (Zillinsky, 1984) y permanece en el suelo como clamidospora o como micelio en residuos infestados (Nyvall, 1999); a diferencia de *F. graminearum*, *F. culmorum* se desconoce el teleomorfo. Se produce esporas asexuales, que son la principal vía de dispersión, el viento o la lluvia que salpica a las espigas de trigo. Los conidios infestan las espigas durante un período de

susceptibilidad durante la antesis. El éxito de la infestación depende de muchos factores, como las condiciones climáticas, principalmente de temperatura, humedad, el nivel de resistencia de los cultivares y la fertilización de nitrógeno, entre otros; sin embargo la humedad es el factor mas importante (Wagacha y Muthomi, 2007).

3.6.5. Hospedantes

F. culmorum es un agente causal de enfermedades en los claveles, lúpulo, puerros, el abeto de Noruega y fresas, cereales como trigo y cebada y donde ocasiona en sorgo la reducción de la germinación de semillas (Leslie y Summerell, 2006).

3.7. *Gibberella moniliformis* Wineland. (*Fusarium verticillioides* (Saccardo) Nirenberg)

3.7.1. Importancia

Las enfermedades causadas por *F. verticillioides* se encuentran distribuida en todo el mundo (Agrios, 1998). Se reporta controversia sobre el nombre de este especie con *F. moniliforme* y *F. verticillioides*. Este último es el aceptado para nombrar esta especie. Generalmente se asocia con maíz donde ocasiona la pudrición del tallo y podredumbre de la mazorca que se traducen en pérdidas de rendimiento y calidad de grano (Leslie y Summerell, 2006).

Un daño colateral son las toxinas que produce como las fumasinas (Fumonisin B1, fumonisin B2, fumonisin B3) que son el grupo de micotoxinas más importantes producidas por *F. verticillioides*; algunas cepas pueden producir éstas en niveles altos; estudios reportados demuestran que una amplia gama de efectos patológicos en animales (Leslie y Summerell, 2006; Whitlow y Hagler, 2005). Chandra *et al.* (2011) encontraron que también produce moniliformina y tricoteceno. En humanos son asociados con *F. verticillioides* en lesiones de la piel (Leslie y Summerell, 2006).

3.7.2. Síntomas

F. verticillioides, es un patógeno que se encuentra en varias plantas causando daños de raíz, tallo y pudriciones que disminuyen el crecimiento de las plántulas (Booth, 1971). Provoca tizones en plántulas de maíz y poco frecuente en trigo. Es común la pudrición de la mazorca y el tallo en maíz (Warham *et al.*, 1998).

3.7.3. Morfología

La pigmentación en el agar varía de nula a grisácea o naranja a violeta gris, violeta oscuro o magenta o casi negro. Los macroconidios son difíciles de encontrar, son hialinos, relativamente largos, con paredes delgadas y su forma varía de curvos a casi rectos; tiene de tres a cinco septos, la célula apical frecuentemente cónica o en punta y la célula basal con muesca o en forma de pie (Leslie y Summerell, 2006). Miden 25-60 por 2-4 μm . Nunca hay clamidosporas en el micelio o los conidios. Los peritecios se presentan rara vez y son esféricos y de color negro azulado, de 250-350 μm de alto por 220-300 μm de diámetro, las ascosporas son hialinas, rectas, en su mayoría con un septo y miden de 4 a 7 x 12 a 17 μm (Warham *et al.*, 1998).

Los microconidios por lo general son hialinos, generalmente unicelulares, pero en ocasiones bicelulares; miden de 5 a 12 x 1 a 3 μm , tienen forma oval o "garrote" y están ligeramente aplanados en cada extremo. Se forman a partir de monofialides, que pueden producirse en pares en forma de "V" para dar una apariencia de "orejas de conejo" (Leslie y Summerell, 2006).

3.7.4. Biología y Epidemiología

Sobreviven en residuos de cosecha y en las semillas. Se propagan por el viento, lluvia, insectos y transmisión por semilla (Ooka y Kommedahl, 1977). La transmisión por semilla se puede encontrar en tejidos asintomáticos en toda la planta (Wilke *et al.*, 2007).

3.7.5. Hospedantes

Este hongo se asocia con una gama amplia de enfermedades, *F. verticillioides* causa pudrición de la parte superior de la caña de azúcar, pudrición del pie en arroz y pudrición de la corona en espárragos; puede infestar hasta 11 000 especies de plantas (Leslie y Summerell, 2006).

3.8. *Haemanectria haematococca* Berkeley & Broome. (*Fusarium solani* (Martius) Appel & Wollenweber emend. Snyder & Hansen.)

3.8.1. Importancia

En 1979 la pudrición de raíz y tallo por *Fusarium solani* (Mart.) Sacc, llegó a ser importante en los almacenes comerciales de papa en el Norte de Carolina y en general esta enfermedad fue importante en el sur de los Estados Unidos. Hoy día se sabe que hasta 1970 la enfermedad era

endémica y en la actualidad se ha distribuido a muchas partes del mundo (Cook y Baker, 1983). Es patógeno de un gran número de plantas, algunas de importancia económica incluyen aguacate, frijol, cítricos, cowpea, orquídeas, pimientos, papa y calabaza. (Leslie y Summerell, 2006).

3.8.2. Síntomas

Las raíces principales de las plantas jóvenes muestran al inicio una mancha ligeramente rojiza, que más tarde adquiere una tonalidad que va de rojo oscuro a pardo y que se extiende hasta cubrir más o menos la raíz principal y la porción del tallo que se encuentra por debajo de la superficie del suelo, o bien aparece en forma de rayas que se extienden por arriba de ella. Por lo general, el crecimiento de la planta se retarda y cuando el clima es seco las hojas pueden tornarse amarillas e incluso desprenderse de la planta (Agrios, 2002).

Las pudriciones de la raíz y del tallo aumentan su severidad, cuando las plantas que están expuestas al patógeno sufren agobio fisiológico (stress) por temperaturas bajas, sequía intermitente o excesiva cantidad de agua en el suelo, herbicidas, compactación de la superficie del suelo debida a las ruedas del tractor que limitan el crecimiento de las raíces de las plantas (Agrios, 2002). En trigo puede destruir la raíz y el tejido de la corona cuando la raíz está débil (Hajieghrari, 2009).

3.8.3. Morfología

El cultivo del hongo en medio de cultivo papa dextrosa agar es generalmente blanco, de aspecto cremoso con micelio esparcido. Se producen a menudo esporodoquios y da color crema, azul o verde. En muchos aislamientos no se producen los pigmentos aunque se pueden observar algunos de color violeta o marrón (Leslie y Summerell, 2006).

Los macroconidios son grandes y de forma ovalada, con célula apical y por lo general con una muesca o un extremo redondeado, con 5 a 7 septos, se desarrollan después de cuatro a siete días, en un principio en forma simple pero más adelante en conidióforos cortos que pronto se unen para formar esporodoquios. *F. solani* puede tener dos cepas tanto heterotática y homotática, a menudo en dos formas morfológicas diferentes. Pueden medir de 35 a 55 x 4.5 o 45 a 100 x 5 a 8 μ . Su estado sexual recibe el nombre de *Haemanectria haematococca* Berkeley & Broome (Leslie y Summerell, 2006; Booth, 1971).

Los microconidios se desarrollan en aislamientos después de 2 a 3 días, pueden ser ovales,

elipsoides, reniformes y fusiformes con 0 ó 1 a 2 veces segmentos. Se forman a partir de conidióforos laterales que en un principio pueden ser fiálides laterales más alargada que se estrechan ligeramente hacia el ápice, más tarde forma microconidioforos que son alargados y ramificados con baja densidad, llegando hasta 400µm de largo (Leslie y Summerell, 2006; Booth, 1971).

Las clamidosporas, se forman rápidamente y en abundancia, puede ser globosas de forma ovalada y pared lisa o rugosa, intercalares entre las hifas o terminales en las ramas laterales de las hifas, generalmente solitarias o en pares, pero ocasionalmente en cadenas cortas.

3.8.4. Biología y Epidemiología.

El inicio de la enfermedad se favorece con una humedad elevada del suelo y temperatura de 22 a 32°C, tiene poca movilidad y se encuentre en suelos infestados en forma de clamidosporas (Burke, 1968). Las condiciones nutricionales y exudados favorecen una germinación rápida y abundante de clamidosporas; los exudados de las semillas la estimulan en un 60% y los de hipocotilo en un 20% (Cook y Snyder, 1965). El desarrollo de la pudrición es mayor cuando las plantas afectadas por *F. solani* están asociadas con nematodos como *Pratylenchus penetrans* o *Meloidogyne* spp. (Hutton *et al.*, 1973).

La diseminación del patógeno está asociada principalmente al agua sobre la superficie del suelo, y ésta ocurre principalmente en forma de clamidosporas o conidios, o bien en implementos agrícolas, en la semilla es portado externamente en las partículas adheridas a la testa (Leyva y González, 2000).

3.8.5. Hospedantes

F. solani tiene una distribución cosmopolita, se considera un patógeno con una gama amplia de hospedantes y se reporta en el cultivo de trigo (Hajieghrari, 2009; Leslie y Summerell, 2006).

3.9. Microscopia Electrónica de Barrido

Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), es una técnica de visualización importante para el estudio de los microorganismos. El procedimiento para la preparación de las muestras para microscopia electrónica de barrido, implica enjuagar superficies para eliminar los residuos, la fijación de la muestra con glutaldehído (Watson *et al.*, 1980), lavado con agua destilada, la deshidratación, el montaje de la muestra en un porta muestra de metal, y el recubrimiento de la muestra con una capa delgada, eléctricamente conductora. Sin embargo, hay varios métodos de preparación de muestras para microscopia electrónica de barrido (Bozzola y Lonnie, 1999).

Los parámetros fundamentales que intervienen en las cualidades de una imagen de un microscopio electrónico de barrido son aumentos, resolución, profundidad de foco, contraste y la relación señal ruido. Los tipos de imágenes que se pueden obtener varían y dependen de las señales que se producen por la interacción entre los electrones y la muestra. Cuando un haz de electrones choca con una muestra y penetra en ella. La profundidad a la que penetran los electrones es directamente proporcional al número atómico de los átomos que la constituyen. A medida que se produce la penetración, los electrones pierden su energía. El MEB es un aparato diseñado para que un haz fino de electrones haga una exploración sistemática de la muestra en observación, produciendo así electrones secundarios que una vez recogidos por un detector son empleados como una señal a partir de la cual se obtiene, en la pantalla de un tubo de rayos catódicos, una imagen tridimensional aumentada de la superficie de la muestra (Ojeda, 1997).

3.10. Identificación Molecular-Reacción en Cadena Polimerasa (PCR)

El primer paso en el análisis de ácidos nucleicos, es extraer el ADN a partir del hongo purificado. La cantidad de ADN y la calidad necesaria para el análisis lo determina el protocolo de extracción empleado. En general, los estudios que se basan en amplificaciones por PCR para el análisis necesitan relativamente poco ADN. Se desarrollaron algunos “primer” de PCR que pueden ser utilizados para amplificar un fragmento específico de una especie particular (Leslie y Summerell, 2006). Varios métodos de PCR se reportan recientemente para el análisis de *Fusarium* en cultivos puros (Knoll *et al.*, 2002).

Las técnicas moleculares basadas en el análisis del ADN, son útiles porque son específicos y sensibles. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se desarrolló para detectar, identificar y

clasificar patógenos de plantas (Martin *et al.*, 2000). Reacción en Cadena de Polimerasa o PCR (por sus siglas en inglés), fue desarrollada por el bioquímico estadounidense Kary Mullis entre 1983 y 1985, que pudo hacer posible sintetizar, en pocas horas, millones de copias de un gene o de una región específica de DNA, a partir de cualquier genoma. Para lograr una verdadera amplificación, la reacción se somete a varios ciclos alternos de calentamiento y enfriamiento para permitir el funcionamiento de la enzima de manera que el iniciador o “primer” sea utilizado para sintetizar cadenas nuevas de DNA de manera exponencial. Esta propiedad permite desnaturalizar el DNA de interés para ser polimerizado sin destruir la enzima, y así se puede multiplicar rápidamente el número de copias de un fragmento específico de DNA. Es posible aislar y amplificar genes específicos, si se tiene la secuencia de un fragmento de DNA del propio gene o de una sección del DNA cercana al gene de interés (Bolívar *et al.*, 2007; Prescott *et al.*, 2002).

El grupo de genes para las moléculas de ARN ribosomales 18'S, 5.8'S y 28'S se considera que son conservados entre los organismos eucariontes y normalmente se emplean como marcadores moleculares. El polimorfismo en la longitud del ADN y la variación en la secuencia de las bases pueden utilizarse para agrupar organismos de acuerdo con su origen y relación evolutiva. La identificación de secuencias de ADN desconocidas también puede realizarse comparándolas con bases de datos de secuencias de nucleótidos de taxones conocidos. Varias copias del ADN ribosomal (ADNr) se encuentran en el genoma eucariota, facilitando la amplificación de pequeñas muestras de ADN. El ADNr también contiene espaciadores entre las regiones codificantes conocidos como espaciadores internos de transcripción (ITS) que presentan secuencias de bases menos conservadas y que pueden utilizarse para la diferenciación entre especies relacionadas o para evaluar divergencias genéticas intraespecíficas (Pfenning y Magalhães, 2012; Turner *et al.*, 1998).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un muestreo durante los ciclos Primavera-Verano 2010 y 2011 donde se extrajeron un aproximado de 200 semillas al azar, en las parcelas de trigo de temporal en los Valles Altos de México, de las variedades Rebeca F2000 y Tlaxcala F2000 del programa de trigo INIFAP.

4.1. Localidades Primavera-Verano 2010/2011

4.1.1. Santa Lucia, Edo. México

Se localiza en el Estado de México, su ubicación geográfica es 19° 27' latitud norte y 98° 53' longitud oeste, a una altitud de 2260 msnm. El clima que presenta es del tipo C (w0) (w) b (i') g, el cual se define como templado subhúmedo, con una precipitación media anual de 636.5 mm, régimen de lluvias en verano, temperatura media anual de 15.2 °C, poca oscilación térmica (INEGI 2013; García, 1988).

4.1.2. Chapingo, Texcoco, Edo. México

Se localiza en el Estado de México en el municipio de Texcoco, su ubicación geográfica es 19° 29' de latitud norte, 98° 53' longitud oeste, a una altitud de 2250 msnm. Con un clima semifrío subhúmedo con lluvias en verano, presenta una precipitación entre los 500 a 700 mm, su temperatura 6 a 16 °C (INEGI 2013; SNM, 2013).

4.1.3. Coatepec, Edo. México

Se localiza en el Estado de México en el municipio de Ixtapaluca su ubicación geográfica es 19° 19' latitud norte y 98° 53' longitud oeste, a una altitud 2320 msnm, con una precipitación media anual de 660 mm, su temperatura media anual de 15.1 °C, máxima de 33 °C y mínima de 8 °C (SNM, 2013; García, 1988).

4.1.4. Juchitepec, Edo. México

Se localiza al sureste del Estado de México, su ubicación geográfica entre los paralelos 19° 01' y 19° 11' de latitud norte; los meridianos 98° 48' y 98° 59' de longitud oeste, situándose a una altitud entre 2680 msnm. Presenta un clima Templado subhúmedo con lluvias en verano, con una

precipitación media anual de 800 a 1100 mm, con temperaturas de 10 a 16 °C (INEGI, 2013; SNM, 2013).

4.1.5. Francisco Madero, Nanacamilpa, Tlaxcala

Se localiza en el estado de Tlaxcala en el municipio de Nanacamilpa de Mariano Arista, su ubicación geográfica es 19° 31' latitud norte y 98° 29' longitud oeste, a una altitud de 2650 msnm, presenta clima tipo C (w), que se clasifica como templado subhúmedo con lluvias en verano, temperatura media anual de 14.4 °C, con una precipitación media anual de 600 a 700 mm (INEGI, 2013).

4.1.6. Nanacamilpa, Tlaxcala

Se localiza al poniente del estado de Tlaxcala en el municipio de Nanacamilpa de Mariano Arista, su ubicación geográfica es 19° 29' latitud norte y 98° 33' longitud oeste, a una altitud de 2811 msnm, presenta clima tipo C (w), que se clasifica como templado subhúmedo con lluvias en verano, temperatura media anual de 14.4 °C, con una precipitación media anual de 700 a 800 mm (INEGI, 2013).

4.1.7. Francisco Villa, Xaltocan, Tlaxcala

Se localiza en el Estado de Tlaxcala en el municipio de Xaltocan. El sitio se ubica a 2,533 msnm en los 19° 36' latitud norte y 98° 28' latitud oeste. Prevalece el clima templado subhúmedo con lluvias en verano, de mayor humedad (87 %) con temperatura que van desde los 12 a 16 °C. La precipitación media anual de 700-900 mm (INEGI, 2013).

4.1.8. Terrenate, Tlaxcala

Se localiza al noreste del estado de Tlaxcala, su ubicación geográfica entre los paralelos 19° 25' y 19° 33' de latitud norte; los meridianos 97° 51' y 98° 02' de longitud oeste; a una altitud de 2680 msnm; presenta un clima templado subhúmedo con lluvias en verano, con temperatura entre 10 a 14 °C, con precipitación media anual entre 600-800 mm (INEGI, 2013).

4.1.9. Texcal, Cuyoaco, Puebla

Se localiza en el municipio de Cuyoaco del estado de Puebla entre los paralelos 19° 28' y 19° 43' de latitud norte; los meridianos 97° 28' y 97° 43' de longitud oeste; a una altitud de 2560 msnm. Con un rango de temperatura entre los 10 a 16 °C, con una precipitación media anual de 600 a 900 mm, con un clima templado subhúmedo con lluvias en verano de mayor humedad (INEGI, 2013).

4.1.10. Tenango del Aire, Edo. México

Se localiza en el Estado de México entre los paralelos 19°07' y 19°11' de latitud norte; los meridianos 98°50' y 98°55' de longitud oeste; a una altitud de 2440 msnm. Con un rango de temperatura entre los 12 a 16 °C, con una precipitación media anual de 700 a 900 mm, con un clima templado subhúmedo con lluvias en verano (INEGI, 2013).

4.1.11. Jilotepec, Edo. México

Se localiza en el Estado de México Entre los paralelos 19° 51' y 20° 11' de latitud norte; los meridianos 99° 25' y 99° 44' de longitud oeste; a una altitud de 2520 msnm. Con un rango de temperatura entre los 10 a 16 °C, con una precipitación media anual de 600 a 1000 mm, con un clima templado subhúmedo con lluvias en verano (INEGI, 2013).

4.2. Variedades Utilizadas

4.2.1. Rebeca F2000

Es una variedad de trigo harinero que se obtuvo que a través del Programa Cooperativo de Mejoramiento Genético entre el INIFAP y CIMMYT; la línea se evaluó por el INIFAP de 1996-2000 en 13 estados de la república en 90 pruebas diferentes. Sus tallos son resistentes al acame, por lo que se puede someter a manejos intensivos en densidad de siembra y fertilización para lograr rendimientos altos; su espigamiento es uniforme y sus espigas maduras son de color amarillo claro, laxas y erectas; su grano es mediano, de color ámbar a rojo claro y consistencia media dura. Bajo la incidencia natural de las enfermedades que se registraron durante su evaluación, esta variedad mostró inmunidad de roya del tallo (*Puccinia graminis* f.sp. *tritici*) y de roya amarilla (*P.*

striiformis f.sp. *tritici*), de moderada resistencia a moderada susceptibilidad a roya de la hoja (*P. triticina*) y moderada resistencia a tizón foliar (*Cochliobolus sativus*), mancha bronceada (*Pyrenophora tritici-repentis*), mancha foliar (*Septoria tritici*), tizón de la gluma (*S. nodorum*), mancha de la hoja (*Fusarium nivale*) y roña de la espiga (*F. graminearum*) (Villaseñor *et al*, 2000a).

4.2.2. Tlaxcala F2000

Es una variedad de trigo harinero que se obtuvo por recombinación genética y selección en el Programa de Mejoramiento Genético de Trigo para Temporal del Campo Experimental Valle de México (CEVAMEX); posee tallos tolerantes al acame, lo que le permite someterla a un manejo medio intensivo en el suministro de semilla y fertilizante nitrogenado para lograr alta productividad; es de espigamiento desuniforme y sus espigas al madurar son de color amarillo claro, laxas y de posición ligeramente curvada; su grano es de tamaño mediano, de color rojo oscuro y de consistencia dura. Es una variedad inmune a roya del tallo (*Puccinia graminis*), moderadamente resistente a roya de la hoja (*P. recondita*) y roya amarilla (*P. striiformis*) y tolerante a las enfermedades conocidas como tizón foliar (*Cochliobolus sativus*), mancha bronceada (*Pyrenophora tritici-repentis*), mancha foliar (*Septoria tritici*), mancha de la hoja (*Fusarium nivale*), tizón de la gluma (*S. nodorum*) y roña de la espiga (*F. graminearum*) (Villaseñor *et al*, 2000b).

4.3. Aislamiento de *Fusarium* spp.

4.3.1. Método Freezing Blotter

Tratamiento previo: se remojaron las semillas durante tres minutos en una solución al 3% de hipoclorito de sodio para evitar la presencia de bacterias y posteriormente se enjuagó con agua destilada (Warham *et al.*, 1998).

Posteriormente: se colocaron los granos de trigo separados por espacios uniformes con ayuda de una plantilla, en una caja transparente como cámara húmeda (Figura 1a), para 80 granos de trigo. Se sellaron las cajas con plástico y se incubaron a 20 °C durante 48 horas alternando luz blanca y luz oscura con intervalos de 12 horas. Posteriormente se colocaron las cajas en el congelador a

temperatura de -15 a -20 °C durante 24 horas. Finalmente se dejaron a 20 °C durante 10 días (Warham *et al.*,1998).

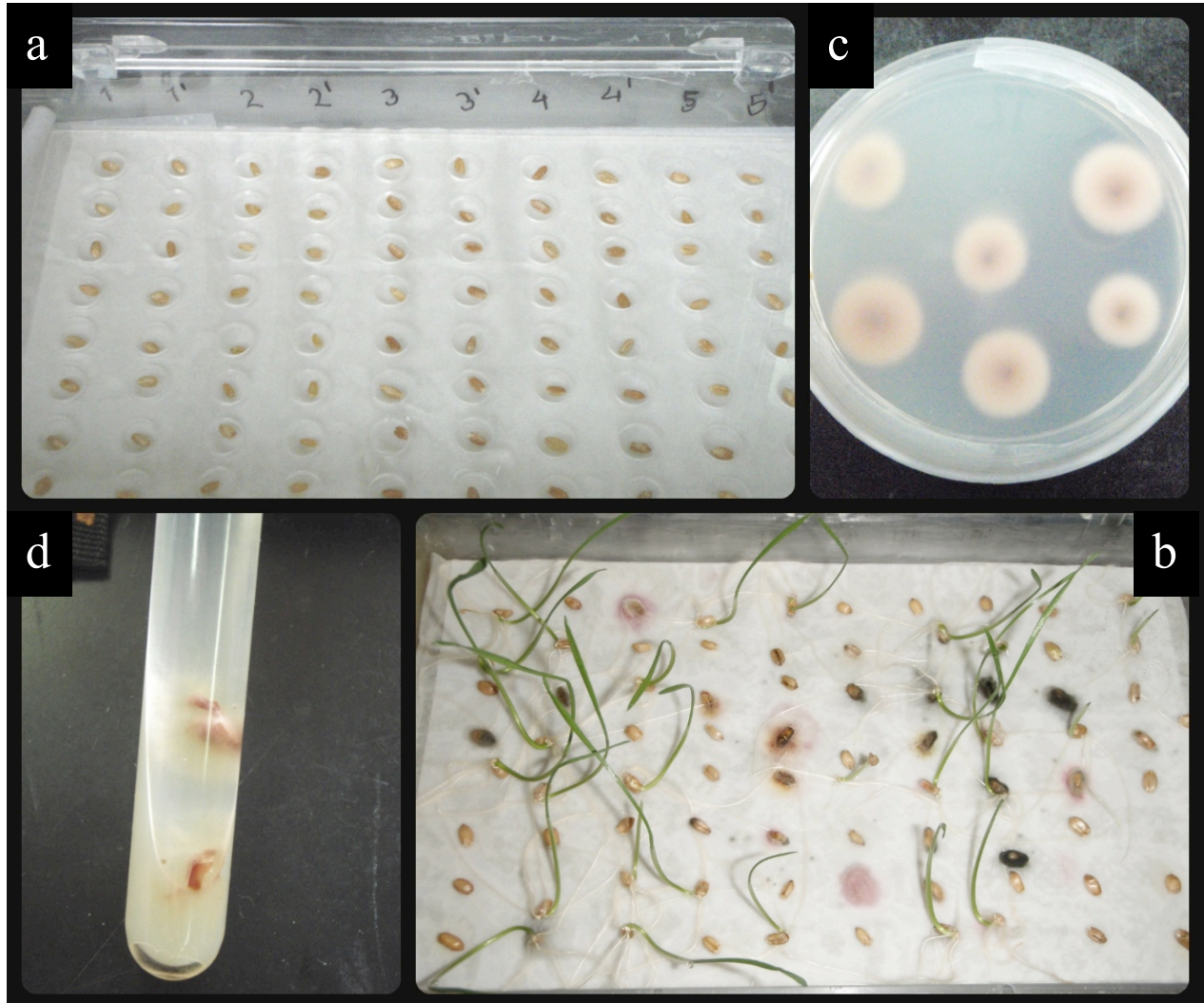


Figura 1. a) Granos de trigo en cajas transparentes; b) esporulación de los hongos; c) aislamiento del hongo en nuevas cajas de PDA; d) conservación del hongo en tubos con PDA y aceite.

4.3.2. Aislamiento y purificación

Cuando las semillas lograron esporular, se obtuvieron los aislados de mayor porcentaje de incidencia que fueron de *Fusarium* spp (Figura 1b). Se transfirieron a medio de cultivo PDA para

posteriormente transferirse a medio de cultivo agua agar y realizar la purificación a través de la técnica de punta de hifa (Figura 1c). Los aislados puros se incrementaron y también se conservaron en tubos con medio de cultivo PDA y aceite mineral (Figura 1d).

4.4. Caracterización Morfológica

Los aislamientos desarrollados en cajas de Petri sobre medio de cultivo AA y PDA se caracterizaron considerando las siguientes. Tasa de crecimiento, pigmentación y aspecto del micelio aéreo. Los aislados destinados a microscopia electrónica de barrido se cultivaron en cajas de Petri con medio AA. De la morfología se tomaron encuentras, el tamaño de los macroconidios, presencia-ausencia y tamaño y forma de microconidios así como la presencia de clamidosporas. Para la identificación a especies *Fusarium*, se basó en las claves taxonómicas de Booth (1971), Nelson *et al.* (1983) y Leslie y Summerell (2006).

4.4.1. Microscopia electrónica de barrido

Se cortaron fragmentos de las cajas petri con agua-agar de los aislamientos de 18 días de crecimiento de 6 x 6 mm para la observación de las estructuras de hongos, las muestras se fijaron en glutaraldehído 2.5 % en amortiguador de fosfatos Sorensen's 0.1M pH 7.2, durante 12 horas. (Figura 2a); después se realizaron tres lavados seriados con amortiguador de fosfatos antes mencionado, cinco minutos en cada cambio. Las muestras se deshidrataron en una serie de etanoles graduales (30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 % 80 % 90 %) por 45 minutos en cada concentración y se repitió tres veces en una concentración de alcohol al 100 % por 20 min. Las muestras se secaron (Figura 2b) en una secadora de punto crítico (Sandri-780A®), se colocaron y orientaron sobre portamuestras usando una cinta de doble adhesión de carbón (Figura 2c) y se recubrieron con oro durante cuatro minutos en una ionizadora (Ion Sputter JFC-1100, Jeol, Fine Coat) (Figura 2d y 2e). Las muestras se observaron y fotografiaron en un Microscopio Electrónico de Barrido (JEOL JSM 6390) (Figura 2f) operando a 15 Kv (Bozzola y Russel, 1999). Se consideraron 100 medidas de macroconidios y microconidios; células apicales y basales, así como tamaño de clamidosporas.

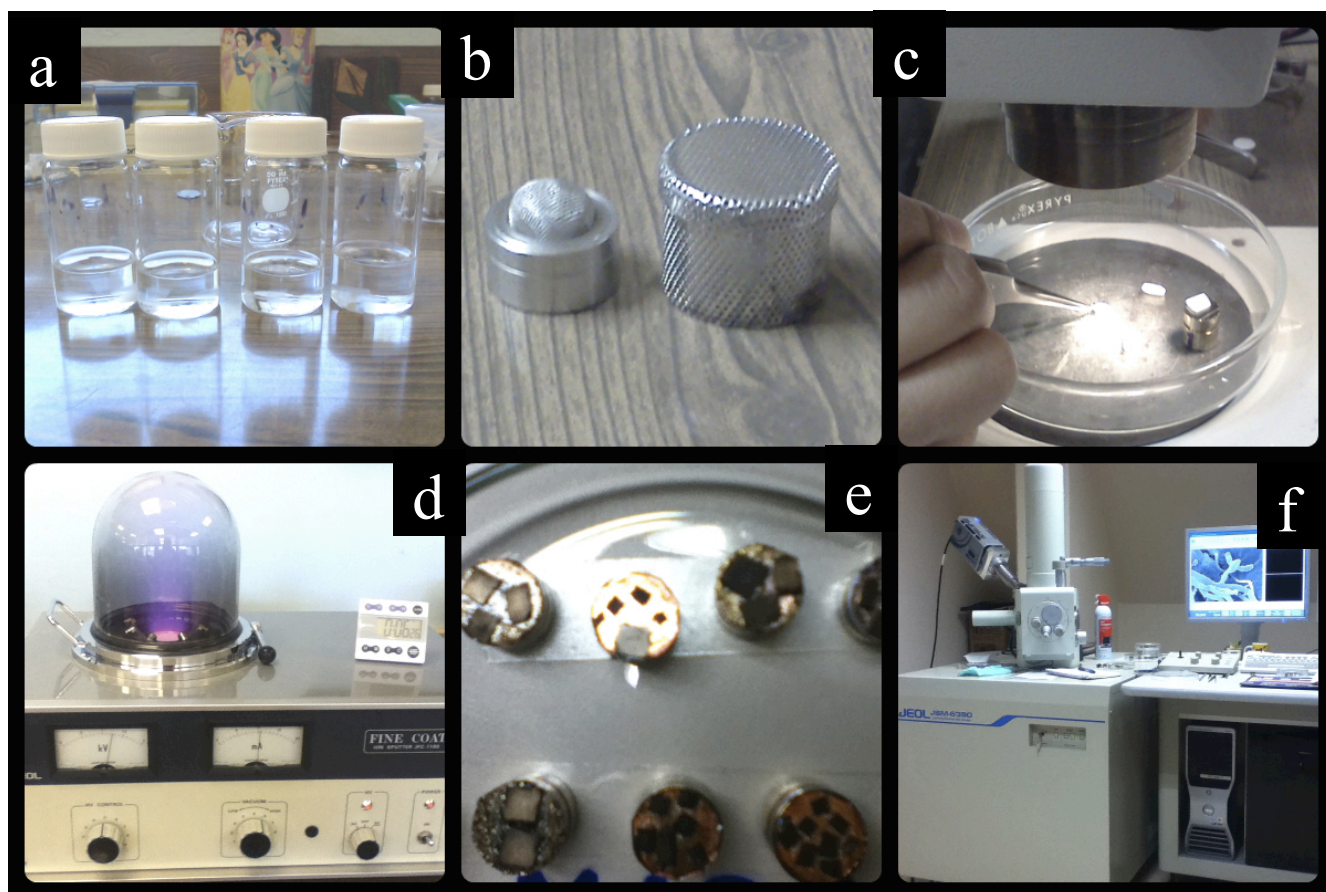


Figura 2. a) Muestras en glutaraldehído 2.5 % en amortiguador de fosfatos Sorensen's; b) recipientes donde se secaron las muestras; c) colocación sobre portamuestras usando una cinta de doble adhesión de carbón; d) recubrimiento con oro durante 4 minutos en una ionizadora (Ion Sputter JFC-1100, Jeol, Fine Coat); e) muestras con recubrimiento de oro; f) microscopio Electrónico de Barrido (JEOL JSM 6390).

4.5. Caracterización Molecular

Dos cepas diferentes fueron consideradas para ser identificadas a través de técnicas moleculares. Las pruebas moleculares mediante la técnica de PCR se realizaron en el Laboratorio de Virus Fitopatógenos del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo (Figura 3a).

4.5.1. Protocolo de Extracción del ADN

De cada cepa con crecimiento micelial se tomó una muestra de *Fusarium* spp., se transfirió a un tubo eppendorf (Figura 3b), se maceró con una punta (Figura 3c), y se adicionó 250µL de buffer AP y después a un volumen de 750µL de buffer AP, luego las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se centrifugó un minuto a 12000rpm. Se retiró el sobrenadante para colocarlo en un nuevo tubo eppendorf, al que se le adicionó fenol-cloroformo (v/v) para limpiar la muestra, sometidos a centrifugación por tres min a 12000rpm y se recuperó la fase acuosa, nuevamente se agregó fenol-cloroformo, se centrifugó por 3 min a 12000rpm y se recuperó la fase acuosa. Se precipitó con 500µL de Isopropanol y 50µL de Acetato de amonio (10 M) y se centrifugó por 10 min a 12 000rpm. Se tiró el sobrenadante para solo conservar la pastilla que se formó. Se lavó la pastilla con 50µL de etanol al 70 % y se centrifugó por tres minutos a 12000rpm y se tiró el etanol, y nuevamente se repitió el paso anterior para lavar la pastilla. Finalmente, se colocaron los tubos eppendorf boca abajo en un papel filtro para dejar secar la pastilla y posteriormente se re-suspendieron en 50µL de H₂O libre de nucleasas. La calidad y concentración del ADN se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Las muestras fueron conservadas en refrigeración a -20°C hasta su uso.

4.5.2. Determinación de calidad de DNA.

La preparación del gel de agarosa se realizó al 0.1 % (0.3 gramos de agarosa en 30mL de solución buffer TAE al 1X). Esta solución se mezcló y se colocó en el horno de microondas aproximadamente 25 segundos ó una solución homogénea. En la cámara de electroforesis se colocó una gota de bromuro de etidio y después se vació la agarosa, se homogenizó, se dejó solidificar el gel por 10 a 15 minutos, se retiraron los peines y los bordes y se colocó la solución buffer TAE al 1X en la cámara hasta cubrir el gel. Las muestras de ADN se cargaron en los espacios, mezclando 3µl de colorante naranja y 5µl de la muestra, colocando posteriormente la tapa de la cámara de electroforesis, y se corrió el gel a 90V por 35 minutos, una vez que terminó este proceso se retiró el gel de la cámara y se colocó bajo la luz ultravioleta en el revelador de geles Gel doc-it ® Imagen system (Figura 3d, e).



Figura 3. a) Material para extracción de ADN; b) micelio del hongo colocado en tubos eppendorf para su extracción de AND; c) macerado hongo para su extracción de DNA; d) corrida de electroforesis en gel de agarosa al 1%; e) revelador de geles Gel doc-it ® Imagen system; f) amplificación del ADN mediante PCR termociclador Biorad C-1000 ® Termal cyler

4.5.3. Amplificación del ADN por PCR

Todas las muestras de ADN fueron amplificadas por duplicado. Cada reacción fue llevada a cabo en un volumen final de 25µl. Los aislamientos de *Fusarium* spp., los primers ITS4 e ITS5 fueron empleados para el procedimiento ya que se reportaron como iniciadores universales de las regiones internas ITS4 e ITS5, ubicadas en los genes ribosomales (rDNA) localizadas entre la subunidad pequeña 18S - 5.8S y la subunidad larga 5.8S - 28S, que fueron amplificadas con la combinación de iniciadores ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') / ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). La amplificación se realizó de acuerdo a los protocolos de Ahrens y Seemüller (1992) con la siguiente combinación de agua estéril ionizada (11.7µL), solución amortiguadora Buffer 1X (5µL), MgCl₂ a 1.5 mM (1.5µL), dNTP's a 200 µM (0.5µL), Taq DNA-polimerasa 2 unidades (0.3µL), iniciadores ITS4 e ITS5 a 20 pM (2µL) por cada uno y muestra de ADN a una 2µL. La reacción de amplificación se realizó en un termociclador Biorad C-1000 ® Thermal cycler (Figura 3f), con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min por 30 ciclos, alineamiento y extensión a 95 °C por 1 min, 55 °C por 1 min, 72 °C por 1 min y una extensión final a 72 °C por 12 min (Figura 4) (While *et al.*, 1990).

El producto se purificó con el método y reactivos de Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Los productos de PCR resultantes fueron visualizados en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. La electroforesis se corrió durante 45min a 95V. Los marcadores moleculares utilizados para determinar el peso molecular de las bandas fueron de 100pb (Invitrogen).

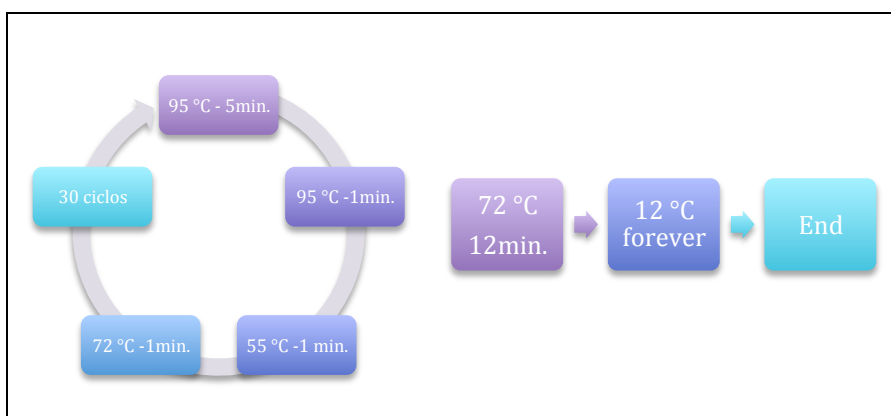


Figura 4. Proceso de amplificación del ADN en el termociclador.

4.5.4. Purificación de ADN por Centrifugación

4.5.4.1. Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)

Se agregó un volumen 10µl de Membrane Binding Solution al producto de PCR y se insertaron las minicolumnas en los tubos colectores y se transfirió el producto de PCR a la minicolumna de ensamble y se incubó a temperatura ambiente durante un minuto. Posteriormente se centrifugó a 16000rpm durante un minuto y se desechó el líquido de los tubos colectores. Para el lavado se añadió 700µl de Membrane Wash Solution y se centrifugó a 16000rpm durante un minuto. Se desechó el filtrado y se volvió a insertar la minicolumna en el tubo de colección. Se volvió a realizar el lavado pero ahora con 500µl solución de Membrane Wash y se centrifugó a 16000rpm durante cinco minutos. Para la elución, cuidadosamente se transfirió la microcolumna a un tubo de microcentrifuga de 1.5ml limpio y se centrifugó durante un minuto con la tapa de la microcentrífuga abierta, para permitir la evaporación de cualquier residuo de etanol. Se añadió 50µl de agua libre de nucleasas a la minicolumna y se dejó incubar a temperatura ambiente durante un minuto y posteriormente se centrifugar a 16000rpm durante un minuto. Se desechó la minicolumna y se almaceno el ADN a -20 °C.

4.6. Secuenciación

El producto de PCR se secuenció en el Instituto de Biotecnología, UNAM, en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN. Las secuencias fueron comparadas usando la herramienta blast en NCBI. La mayor similitud de las secuencias del banco fueron utilizados para la identificación. Las secuencias obtenidas de los cultivos estaban alineadas.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Incidencia de *Fusarium* spp.

En el ciclo P/V 2010 la incidencia de *Fusarium* spp. en granos de trigo reportó niveles elevados en la variedad Rebeca F2000. Las localidades de Francisco I. Madero, Coatepec y Juchitepec, alcanzaron porcentajes de 45.8, 41.7 y 33.3%, respectivamente. La variedad Tlaxcala F2000 obtuvo porcentajes menores en la mayoría de las localidades, sin embargo la de Francisco I. Madero obtuvo 41.7% (Cuadro 1 y Figura 5).

Cuadro 1. Incidencia de *Fusarium* spp. en las localidades de los Valles altos de México durante los ciclos de producción Primavera-Verano de 2010 y 2011, así como las condiciones de precipitación y temperaturas dominantes para las regiones de estudio.

Localidad	Incidencia % Rebeca F2000		Incidencia % Tlaxcala F2000		Condiciones ambientales		
	2010	2011	2010	2011	Precipitación (mm) 2010 2011		Temperatura °C
Santa Lucia	20.8	41.7	29.2	20.8	360	417	16.2
Chapingo	20.8	12.5	20.8	29.2	341	392	16.5
Coatepec	41.7	20.8	16.7	12.5	540	405	15.9
Juchitepec	33.3	45.8	37.5	45.8	623	689	14.1
Francisco I. Madero	45.8	-	41.7	-	562	--	14.4
Nanacamilpa	16.7	29.2	20.8	20.8	590	610	13.8
Francisco Villa	25.0	-	25.0	-	460	--	14.3
Terrenate	29.2	-	16.7	-	479	--	13.8
Texcal	-	41.7	-	20.8	--	497	14.7
Tenango del Aire	-	33.3	-	25.0	--	560	15.0
Jilotepec	-	20.8	-	29.2	--	514	16.4

Durante el ciclo P/V 2011, los granos de la variedad Rebeca F2000 también presentaron porcentajes mayores en las localidades de Juchitepec, Santa Lucia, Texcal, Coatepec, Tenango del Aire y Nanacamilpa (Cuadro 1 y Figura 6). La presencia y diseminación de *Fusarium* spp. está relacionada con las condiciones ambientales y la susceptibilidad del material vegetal, lo que resalta en este trabajo (Cuadro 1). La variedad Tlaxcala F2000 reportó valores mayores de *Fusarium* spp. en las localidades de Juchitepec, Jilotepec y Chapingo, con porcentajes de 45.8 y 29.2 en las dos últimas. Las dos variedades presentaron porcentajes similares de incidencia en la localidad de Juchitepec (45.8 %) evento que está relacionado con los valores elevados de precipitación que van

de 800 a 1100mm (Cuadro 1), siendo la localidad con mayor humedad lo que condiciona de manera ideal el desarrollo de *Fusarium* spp. en las semillas.

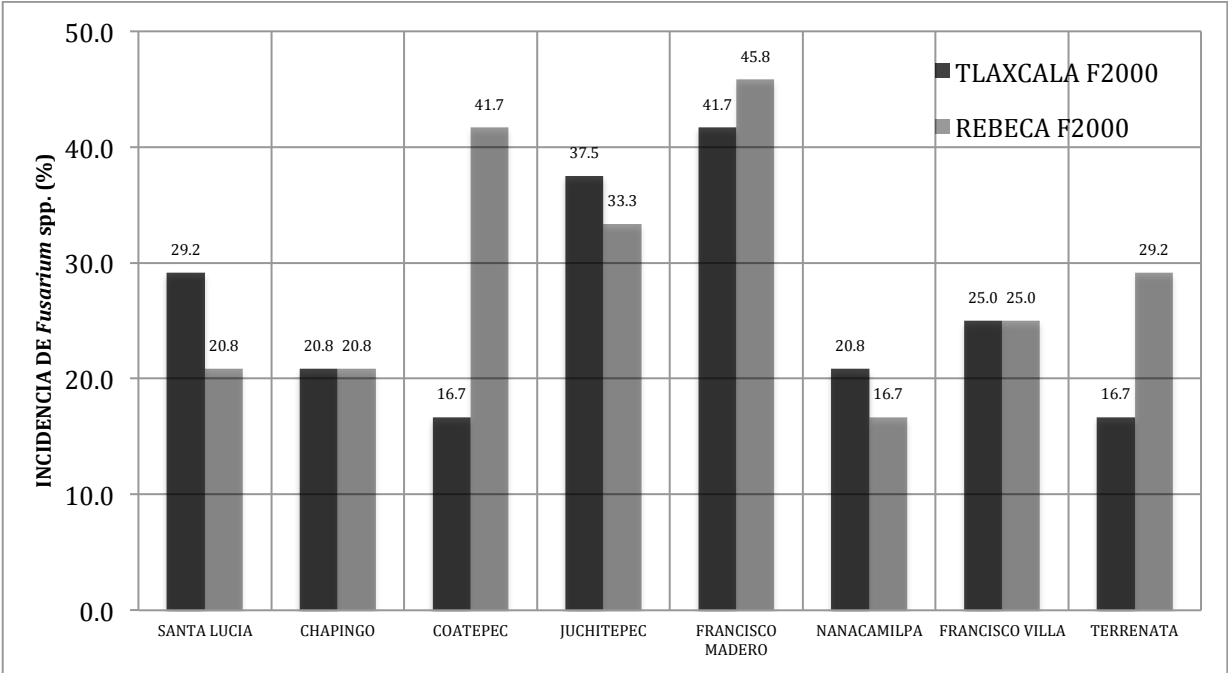


Figura 5. Frecuencia de hongos encontrados en las variedades de trigo Rebeca F2000 y Tlaxcala F2000 durante el ciclo P/V 2010.

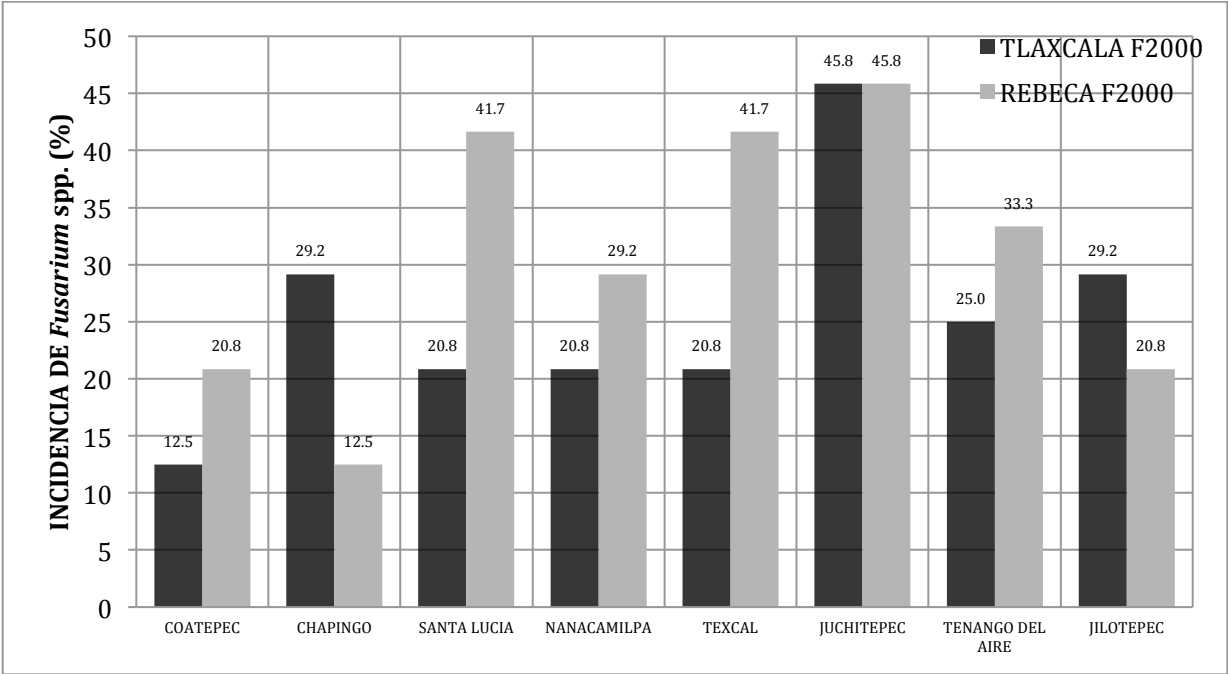


Figura 6. Frecuencia de hongos encontrados en las variedades de trigo Rebeca F2000 y Tlaxcala F2000 durante el ciclo P/V 2011.

5.2. Caracterización Morfológica

De las muestras provenientes de las diferentes localidades de los ciclos 2010 y 2011 se obtuvieron 64 aislamientos de *Fusarium* spp., pertenecientes a las siguientes cinco especies: *F. avenaceum*, *F. graminearum*, *F. verticilloides*, *F. nivale* y *F. solani*, de acuerdo a la caracterización morfológica. Los aislados cultivados en medio PDA desarrollaron una pigmentación y tipo de micelio aéreo que se describe en el Cuadro2; así como las medidas obtenidas por microscopia electrónica de barrido (Cuadro 3).

Cuadro2. Características de las colonias de aislamientos de *Fusarium* spp. desarrolladas en medio de cultivo papa dextrosa agar.

	Crecimiento	Pigmentacion	Micelio
<i>F. avenaceum</i>	Rápido	Blanco a rosa, con superficie rosa a marron	Algodonoso
<i>F. graminearum</i>	Rápido	Rosado a purpura en ambos lados	Algodonoso
<i>F. verticilloides</i>	Lento	Rosado a purpura en ambos lados	Algodonoso
<i>F. nivale</i>	Lento	Reverso purpura, superficie blanca	Algodonoso
<i>F. solani</i>	Rápido	Blanco, superficie de rosa a marron	Algodonoso

Cuadro3. Dimensiones de macroconidios, microconidios y clamidosporas, sobre medio de cultivo agua agar.

	Macroconidios (µm)		Microconidios (µm)		Clamidosporas (µm)	
<i>F. avenaceum</i>	33.30	x 2.20	13.41	x 1.80	5.98	x 6.34
<i>F. solani</i>	Ausentes		9.59	x 3.75	5.64	x 5.86
<i>F. graminearum</i>	30.36	x 2.38	Ausentes		Ausentes	
<i>F. verticilloides</i>	16.10	x 2.20	7.62	x 1.95	Ausentes	
<i>F. nivale</i>	Conidios 5.85x 1.35				Ausentes	

5.2.1. *Fusarium avenaceum*

Los síntomas en los granos de trigo causados por *F.avenaceum* fueron arrugamiento y pérdida de peso (Figura 7a). La tasa de crecimiento del hongo en PDA fue rápida, formó abundante micelio que varió de blanco a rosado y pasó a un naranja pálido a marrón después de 20 días (Figura 7b, 7c y 7d). Los macroconidios fueron largos, delgados y más o menos curvos de manera uniforme y con una célula apical alargada acabada en punta y una célula basal por lo general dentada, de tamaño de $33.3 \times 2.2 \mu\text{m}$ (Figura 8a), el número de septos generalmente fue de cinco, pero se observaron de tres y cuatro (Figura 8b y c); los microconidios de uno a dos septos con una media de $13.41 \times 1.8\mu\text{m}$ (Figura 8d); se observaron clamidosporas con una media de $5.98 \times 6.34\mu\text{m}$ (Figura 8f). De las células conidiógenas se presentaron monofialides (Figura 8e). Las características obtenidas coinciden por las reportadas por Leslie y Summerell (2006), Warhamet *al.*(1998) y Zillinsky(1984), para la especie *Fusarium avenaceum*.

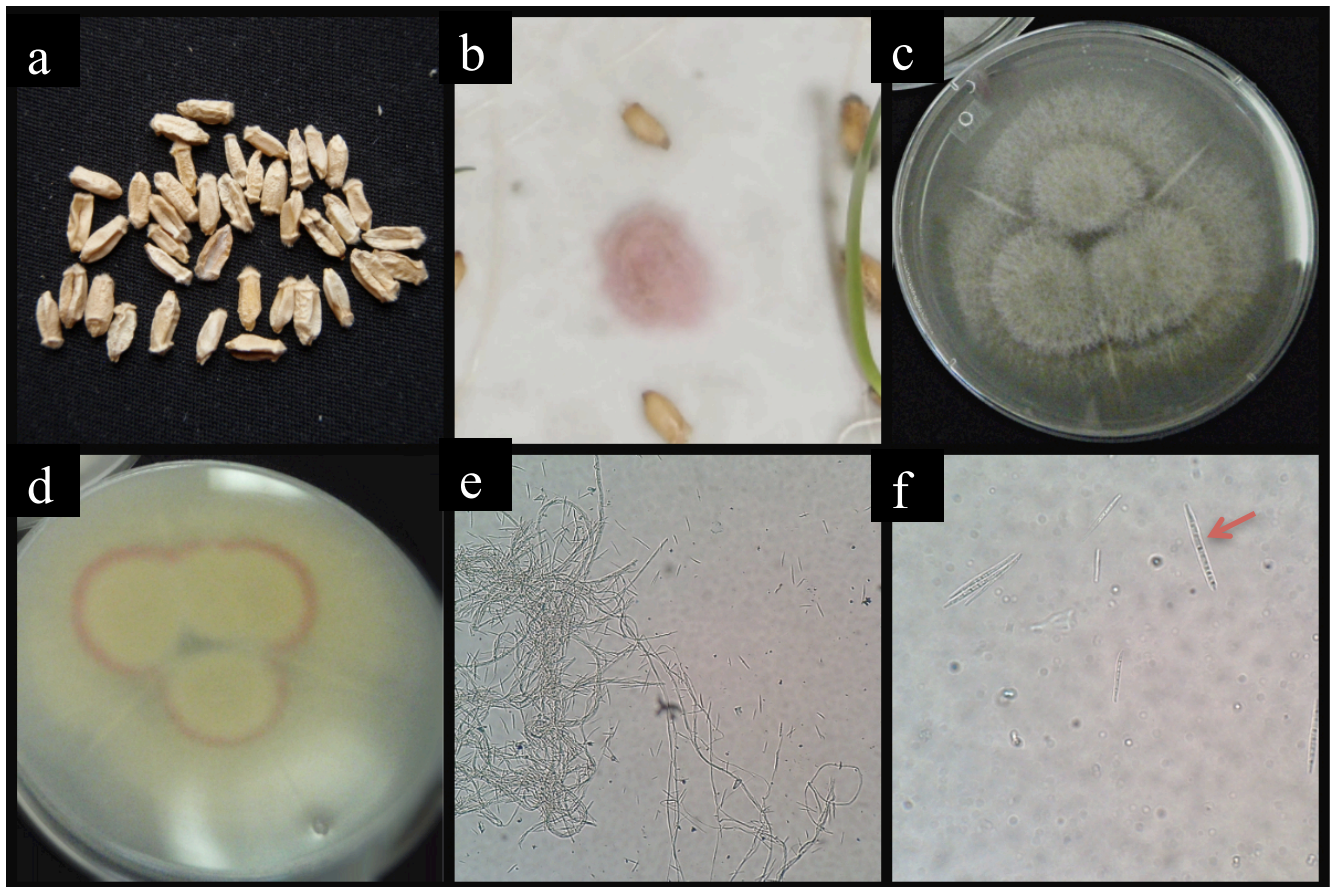


Figura 7. a) Síntomas de granos de trigo; b) crecimiento de la colonia de *F. avenaceum* en los granos de trigo; c) crecimiento de la colonia en PDA, micelio algodonoso; d) superficie de la colonia en PDA; e) micelio y macroconidios; f) macroconidios rectos.

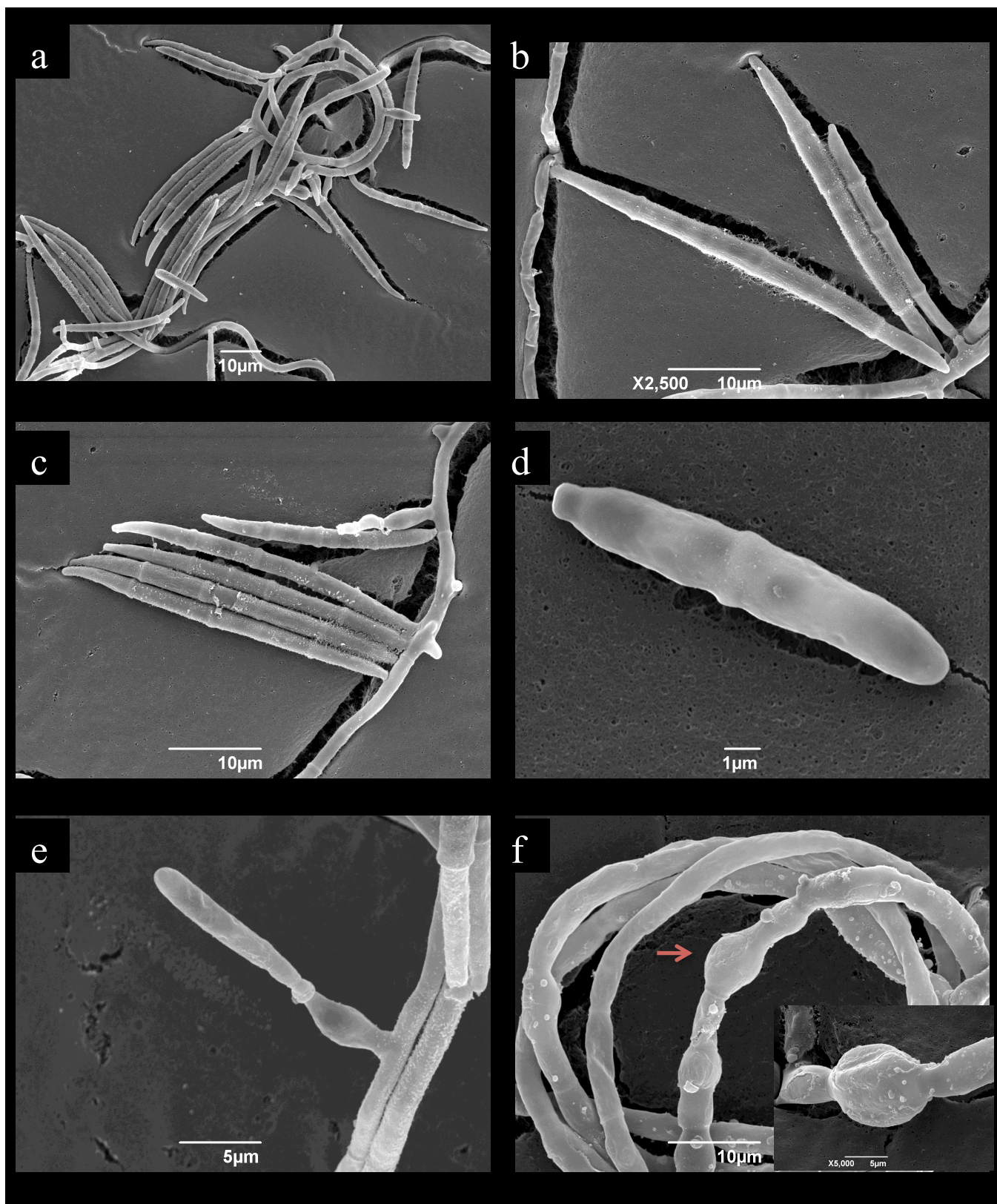


Figura 8. a) Aislado de *F. avenaceum* medio de cultivo AA; b y c) macroconidios de 4 y 5 septos adheridos al micelio; d) microconidio de 2 septos; e) monofialide; f) clamidosporas intercalares, y en cadena.

5.2.2. *Fusarium graminearum*

Granos de trigo chupados y de bajo peso fueron frecuentes en aquellos donde se obtuvo a *F. graminearum*, además de adquirir una coloración blanquecina (Figura 9a y b). Los aislados presentaron una coloración de rosado a púrpura en ambos lados (Figura 9c y d). Los macroconidios obtuvieron una media de $30.36 \times 2.38 \mu\text{m}$ y el número de septos fue de cinco a seis (Figura 9e y f), rectos o moderadamente curvos con la superficie ventral recta y el lado dorsal suavemente arqueado y con frecuencia tienen una célula apical alargada que se curva y adelgaza abruptamente hacia un punto y la morfología de la célula basal bien desarrollada en la forma del pie (Figura 10a, b, c y d). Todas las características coinciden con las descritas por Leslie y Summerell (2006) y Zillinsky (1984) para la especie *F. graminearum*.

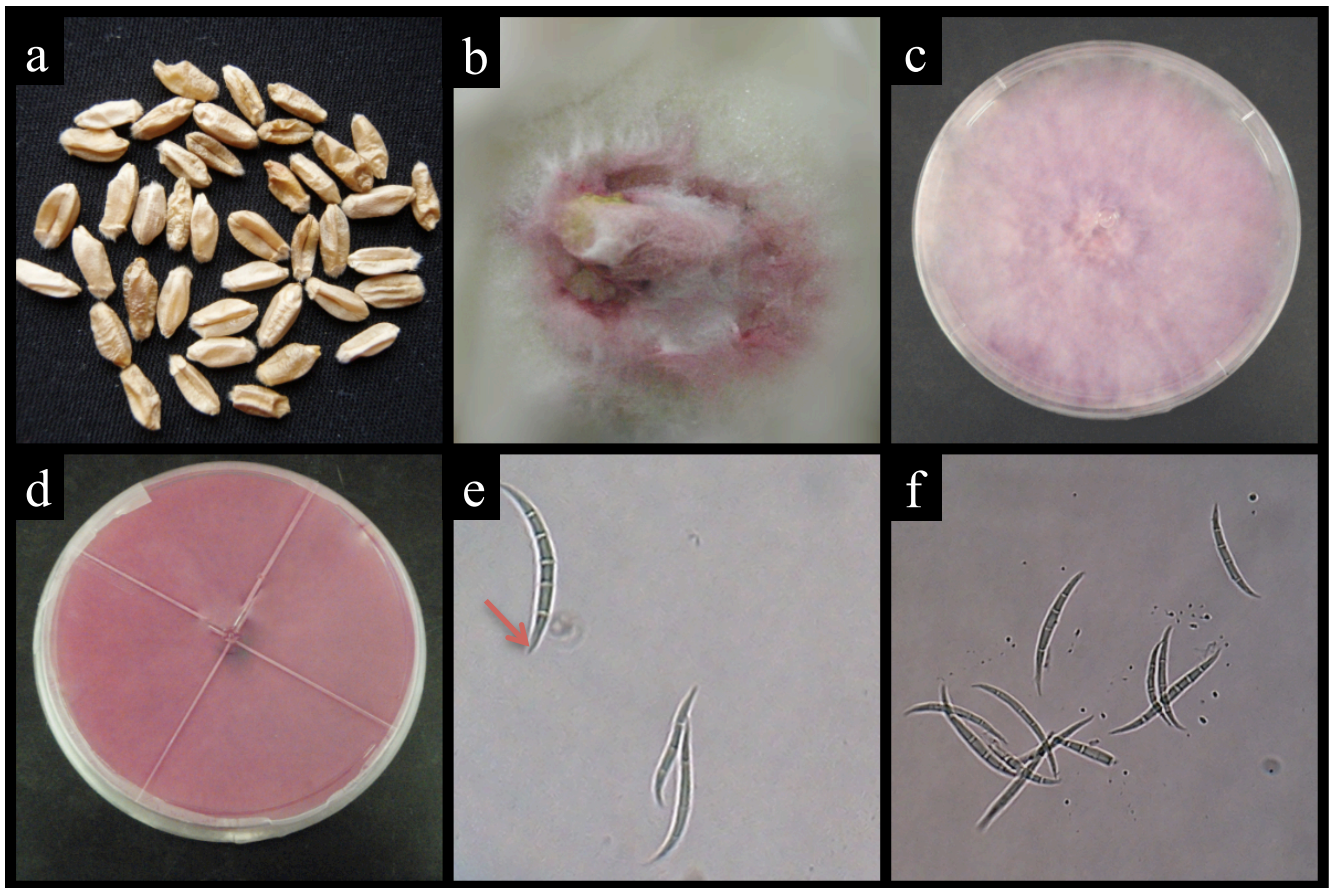


Figura 9. a) Síntomas de granos de trigo; b) desarrollo de la colonia de *F. graminearum* en de granos de trigo; c) crecimiento del micelio aéreo de la colonia en PDA, micelio algodonoso rosaceo-violeta; d) superficie de la colonia en PDA; e) macroconidios, célula basal en forma de pie; f) macroconidios de varias formas y de 5-6 septos.

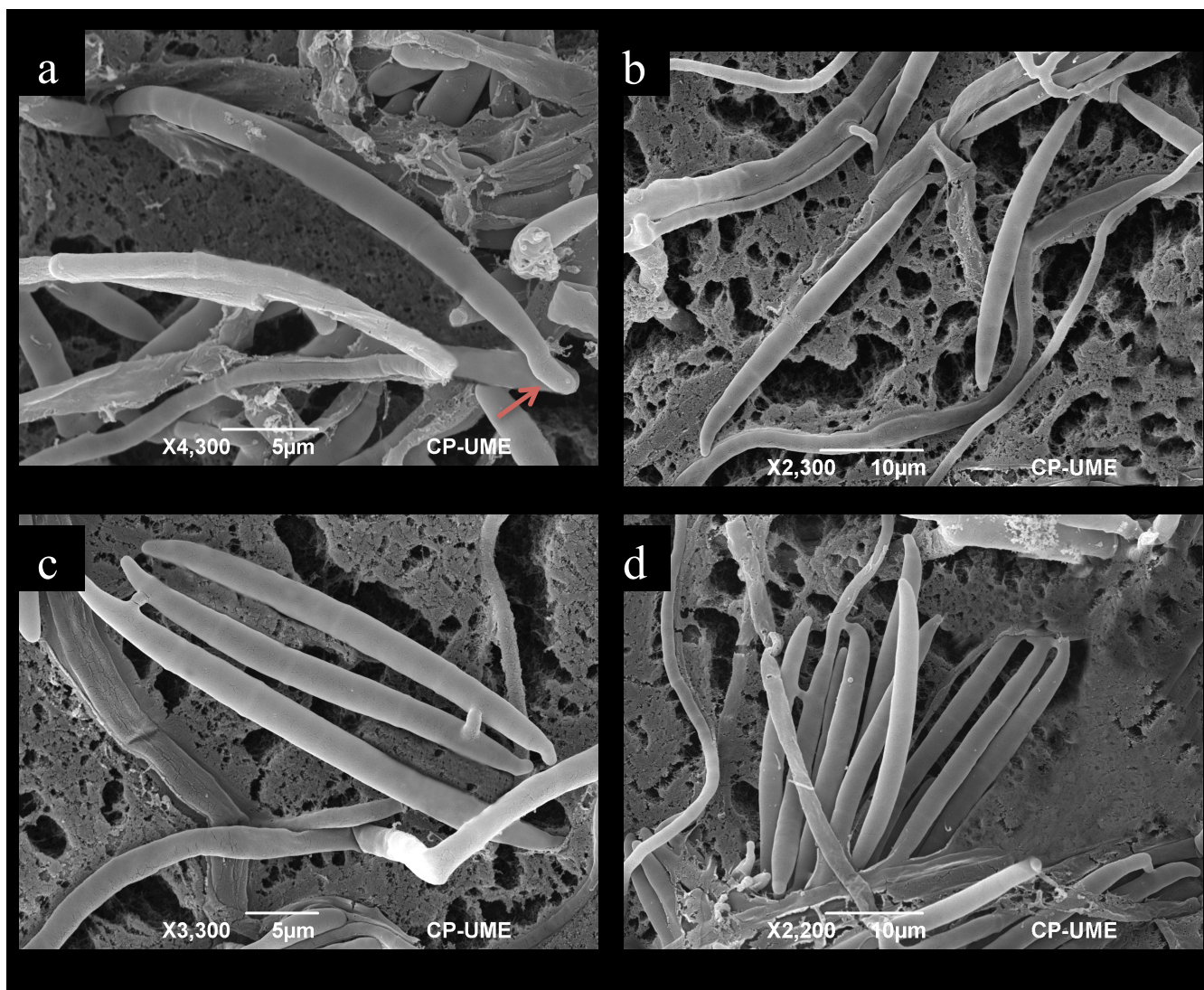


Figura 10. a) Macroconidio de *F. graminearum* con célula basal en forma de pie; b, c y d) macroconidios de cuatro y cinco septos ligeramente curvos, célula apical en punta y célula basal en forma de pie.

5.2.3. *Fusarium verticilloides*

La pigmentación en el medio PDA varió, desde un micelio blanquecino algodonoso a rosáceo-violeta y los granos se observaron chupados y descoloridos (Figura 11a, b, c y d). Los macroconidios fueron escasos, lo que coincide con lo señalado por Leslie y Summerell (2006) quienes aseveran que su desarrollo es poco común; sin embargo los pocos encontrados tuvieron las mediciones de $16.10 \times 2.20 \mu\text{m}$ (Figura 12. a y b). No se observaron clamidosporas lo cual coincide con lo reportado por Warham *et al.* (1998). Se observaron abundantes microconidios (Figura 11. e y f), generalmente unicelulares, pero en ocasiones bicelulares, con medias de $7.62 \times 1.95 \mu\text{m}$, con forma oval o de “garrote” y ligeramente aplanados en cada extremo (Figura 12c, d y e), que se formaron a partir monofialides y se observaron en pares en forma de “V” para dar una apariencia de “orejas de conejo” Figura 12 f). Leslie y Summerell (2006) encontraron características similares a las de este trabajo para la especie *Fusarium verticilloides*.

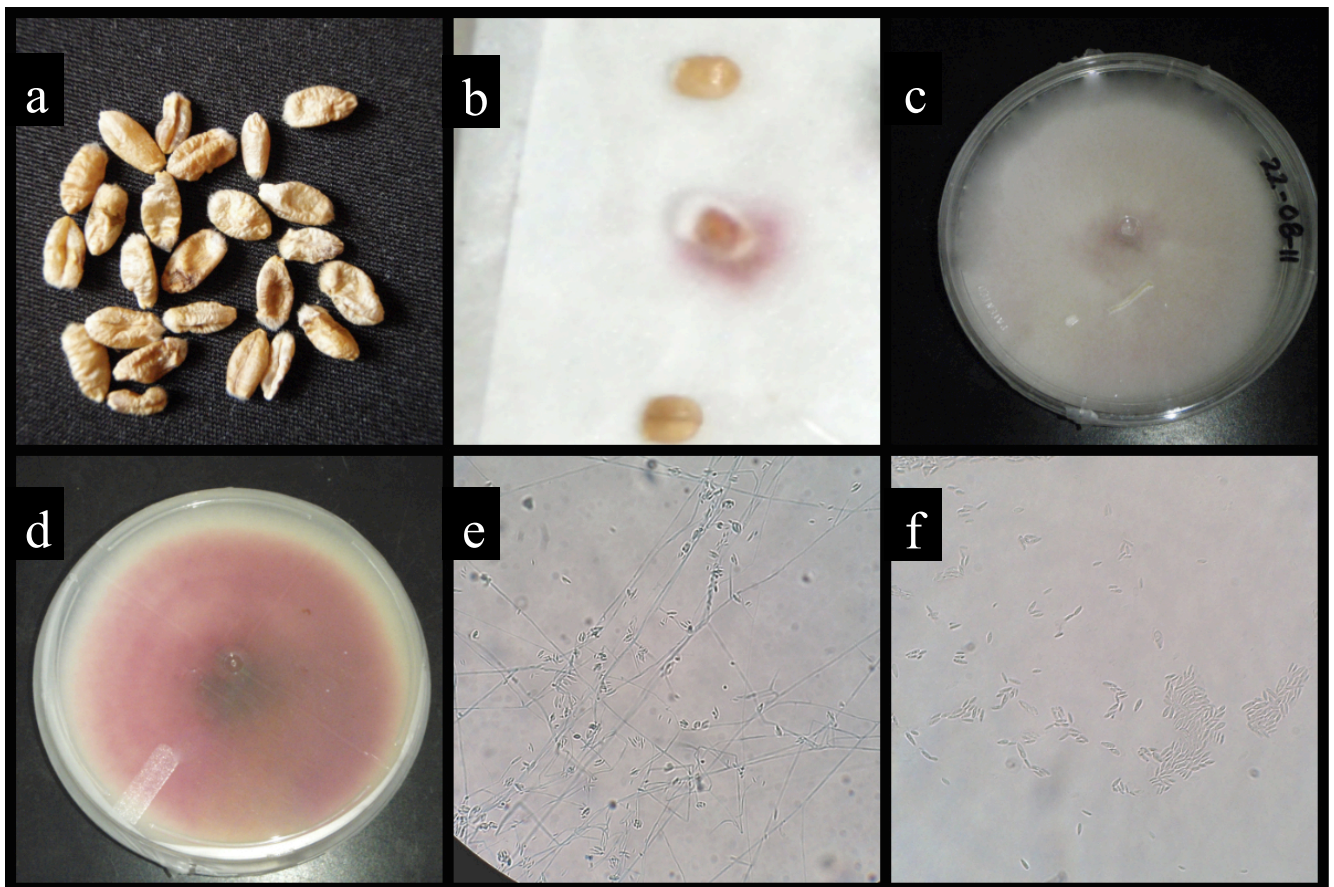


Figura 11. a) Síntomas en granos de trigo; b) crecimiento de la colonia de *F. verticilloides* en los granos de trigo; c) crecimiento aéreo de la colonia en PDA, micelio algodonoso blanquecino a rosáceo; d) superficie de la colonia en PDA, color violeta; e y f) microconidios

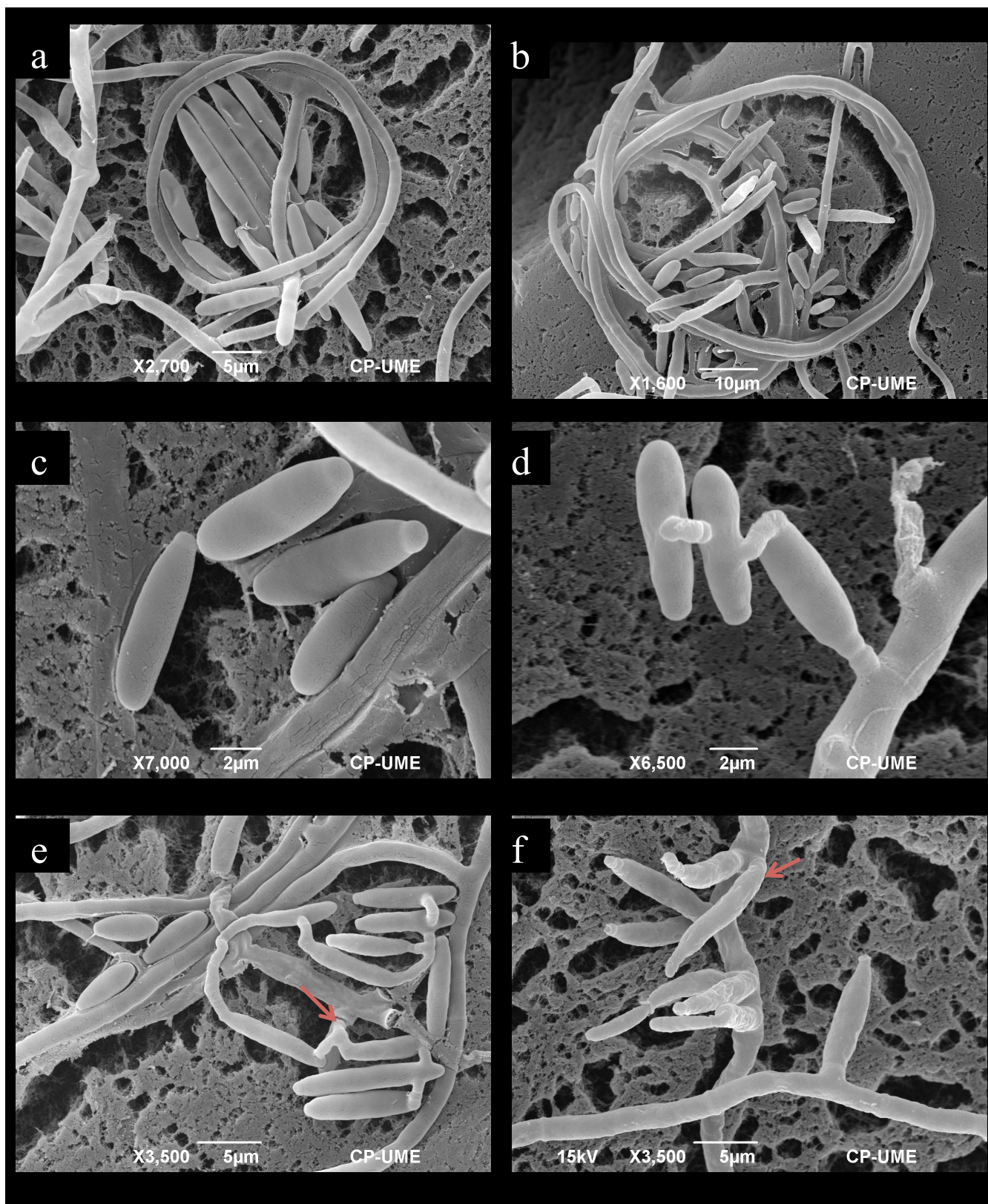


Figura 12. a y b) Macroconidios y microconidios de *F. verticilloides*; c) microconidios unicelulares; d) microconidios adheridos al micelio; e) microconidios a partir de monifialides en forma de “V”; f) monifialides en forma de “V”.

5.2.4. *Fusarium nivale*

El micelio que se desarrolló sobre los granos infestados fue de color blanquecino a rosado. Los aislados presentaron en la superficie una coloración púrpura y al reverso el micelio algodonoso blanquecino (Figura 13 a, b c y d); estas características obtenidas de la especie coinciden con las descritas por Warham *et al.* (1998); los conidios se apreciaron cortos (Figura 13 e y f) curvos y se adelgazan en sus extremos, las células del pie no se apreciaron marcadas y midieron $5.85 \times 1.35 \mu\text{m}$ (Figura 14. a, b, c y d).

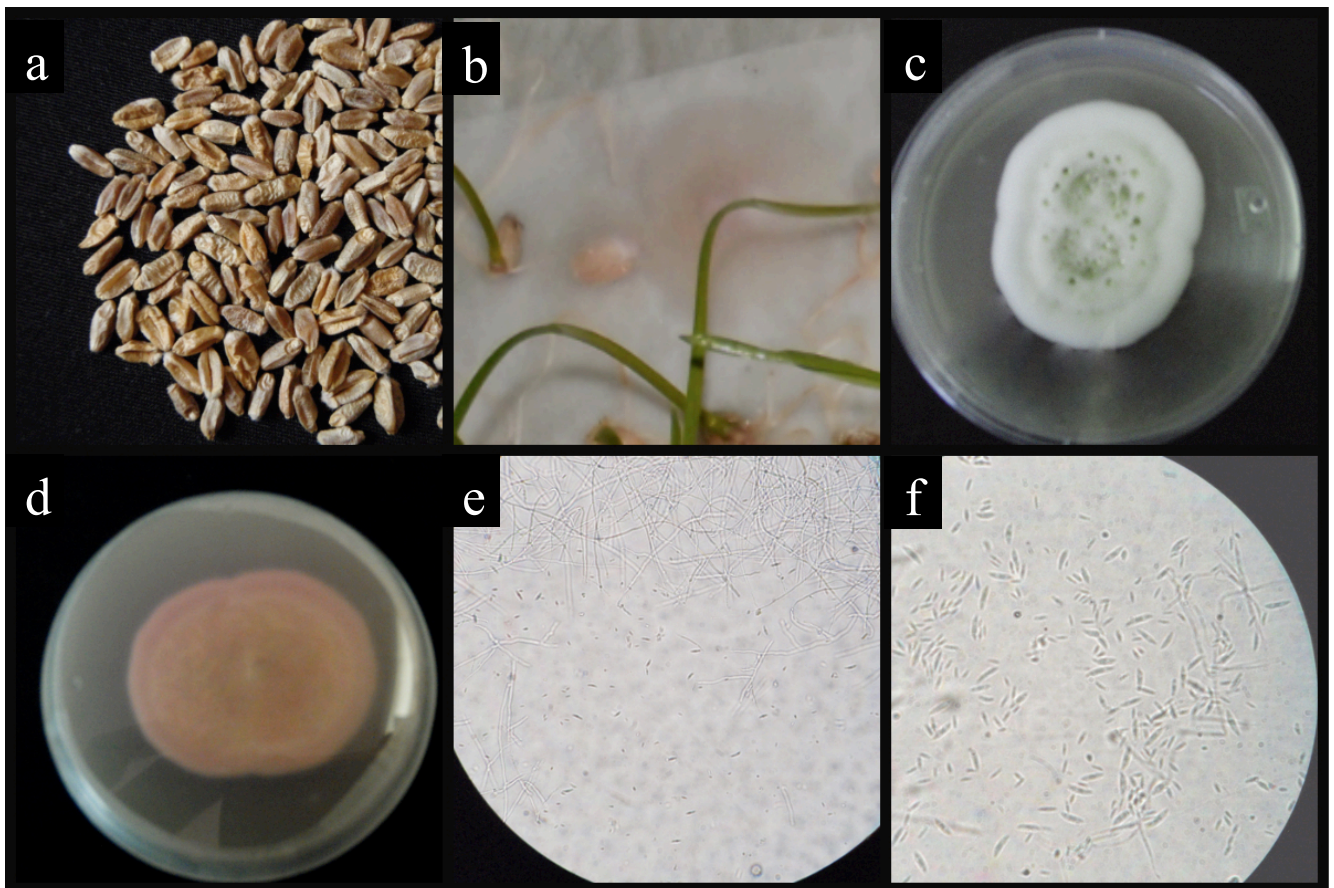


Figura 13. a) Síntomas de granos de trigo; b) crecimiento de la colonia de *F. nivale* en los granos de trigo; c) crecimiento de la colonia en PDA, micelio algodonoso blanquecino-rosado; d) superficie de la colonia en PDA, de color rosáceo a violeta; e y f) conidios.

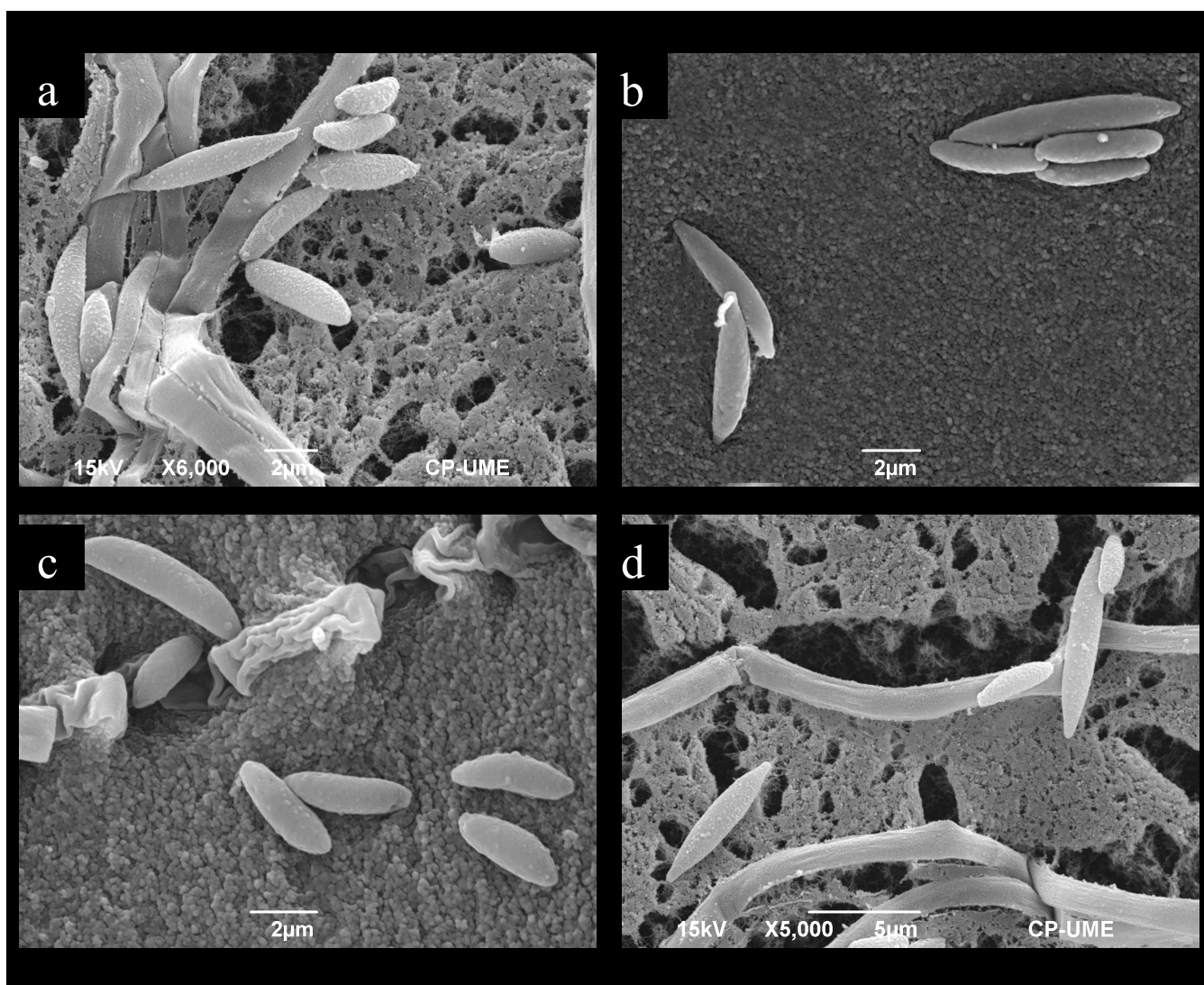


Figura 14. a, b, c y d) Conidios de *F. nivale* cortos y curvos, se adelgazan en sus extremos de diversos tamaños.

5.2.5. *Fusarium solani*

En los medios de cultivo PDA el hongo presentó un micelio algodonoso con coloración de blanco a cremoso (Figura 15b, c y d) y los granos se observaron de bajo peso y descoloridos (Figura 15a). Se observaron microconidios de diversas formas ovales, elipsoides, reniformes y fusiformes con una a dos septos con medidas de $9.59 \times 3.74 \mu\text{m}$ (Figura 16a, b y c). No se observaron macroconidios. Las clamidosporas (Figura 15e y f) se formaron rápidamente y en abundancia, globosas de forma ovalada y pared lisa o rugosa, intercalares entre las hifas o terminales en las ramas laterales de las mismas, generalmente se presentaron solas o en parejas, y ocasionalmente en cadenas cortas (Figura 16d, e y f). Todas las características coinciden con las reportadas por Leslie y Summerell (2006) y Booth (1971) para la especie *F. solani*.

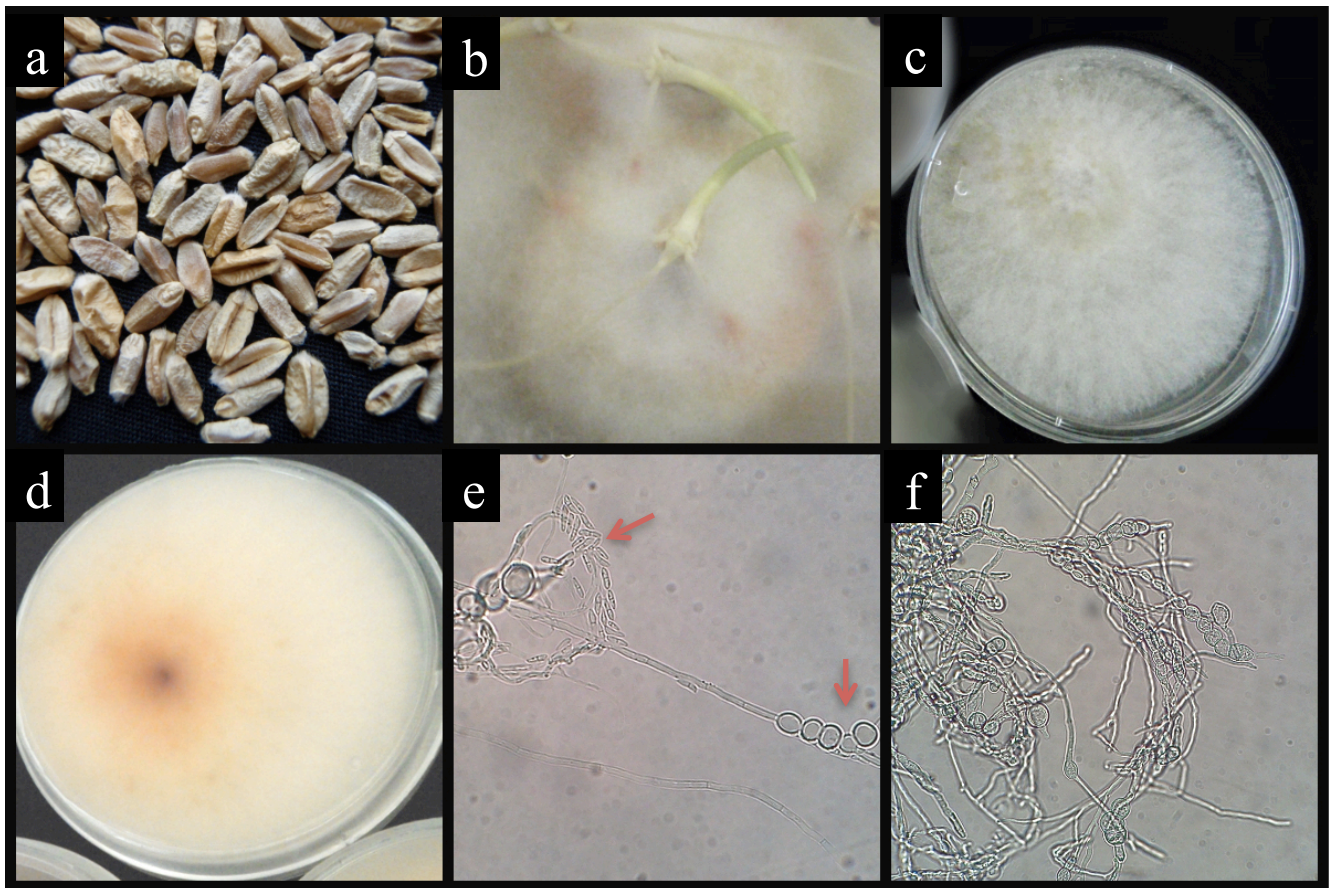


Figura 15. a) Síntomas de granos de trigo; b) crecimiento de la colonia de *F. solani*; c) crecimiento de la colonia en PDA, micelio algodonoso; d) superficie de la colonia en PDA; e) microconidios con dos septos y clamidosporas; f) clamidosporas en cadenas cortas.

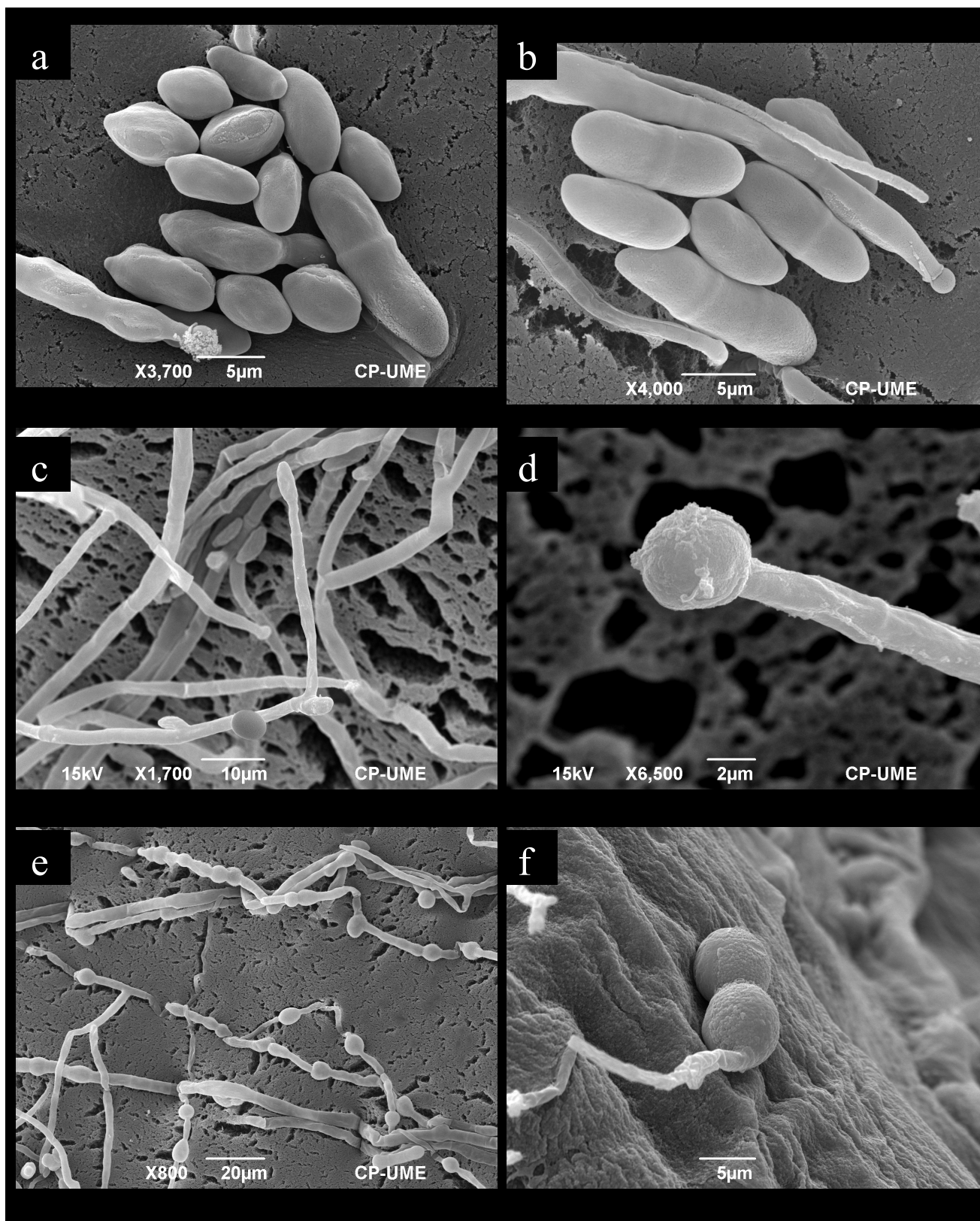


Figura 16. a) Microconidios de *F.solani*; b) microconidios de dos y tres septos; c) monofialides. d) clamidospora terminal en las ramas laterales de las hifas; e) clamidosporas en cadena; y f) clamidospora en parejas.

5.3. Caracterización Molecular

Se realizaron pruebas moleculares para confirmar las especies *F. avenaceum* y *F. solani*.

5.3.1. Secuenciación de *F. avenaceum* y *F. solani*

En la extracción de ADN se obtuvieron resultados aceptables, el producto de extracción mostró buena cantidad e integridad por las bandas, con un buen contenido de ADN (Figura 17a). Con los iniciadores ITS 4/ ITS 5 se obtuvo el producto PCR con una banda de 600 pb visualizado mediante electroforesis, utilizando un marcador molecular (M.M) de 100pb (Figura 17b), (While, 1998). Los resultados obtenidos de la secuenciación fueron comparados usando el banco de genes del Centro Nacional para la Información de la Biotecnología de Estados Unidos (NCBI) donde se obtuvo para *F. avenaceum* una identidad del 99% con una cobertura del 98% para un resultado de 558pb; para *F. solani* una de identidad 98% y una cobertura 98 % con 561pb.

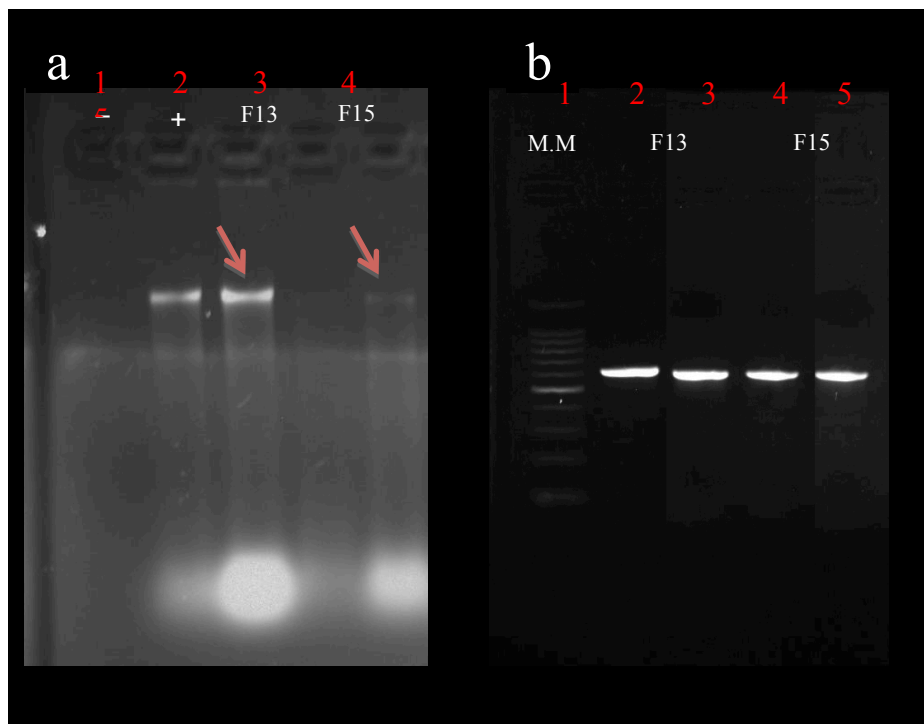


Figura 17. a) Electroforesis de extracción de AND (-) negativo, (+) positivo, (F13) DNA muestra *F. avenaceum*, (F15) DNA muestra *F. solani*; b) Electroforesis de producto de PCR (M.M) marcador molecular.

5.3.1.1. Secuencia de ADN de *F. avenaceum*

TTGTCGTACGMGGAGGGACATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCTTA
ATGTTGCCTCGGCGGATCAGCCCGCGCCCCGTAAAACGGGACGGCCCGCCAGAGGACCCA
AACTCTAATGTTTCTTATTGTAACCTTCTGAGTAAAACAAACAAATAAATCAAAAACCTTCAACAAC
GGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGC
AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCTGGTATTCCGGCGGGCA
TGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCCTCGGGTTTGGTGTGTTGGGGATCGGCTCT
GCCTTCTGGCGGTGCCGCCCCCGAAATACATTGGCGGTCTCGCTGCAGCCTCCATTGCGTA
GTAGCTAACACCTCGCAACTGGAACGCGGCGCGGCCATGCCGTAAAACCCCAACTTCTGAA
TGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAAGCCGGRAGGAAA

5.3.1.2. Secuencia de ADN de *F. solani*

TAGCTCGGCGGAGGGACATTACCGAGTCTAAACAACCTCATCAACCCTGTGAACATACC
TAAAACGTTGCTTCGGCGGGAACAGACGGCCCCGTGAAACGGGCGCCCCCGCCAGA
GGACCCCTAACTCTGTTGCCATATGTATCTTCTGAGTAAACAAGCAAATAAATTAAA
ACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGAT
AAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCC
CGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACAACCCTCAGGCCCCCGG
GCCTGGCGTTGGGGATCGGCGAGGCGCCCCCGCGGGCACGCGCCGTCCCCCAAATAC
AGTGGCGATCCCGCCGCAGCTTCCATTGCGTAGTAGCTAACACCTCGCAACTGGAGAG
CGGCGCGGCCATGCCGTAAAACACCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGAATCAGGTAGG
AATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAGCCSGGAGGAA

5.4. Especies de *Fusarium* spp. con riesgo colateral

Variedad Rebeca F2000 Ciclo P/V 2010. La especie dominante en los Valles altos de México en la variedad Rebeca F2000 fue *F. avenaceum*, se presentó en todas las localidades, pero con mayor frecuencia 25% en las de Juchitepec y Francisco I. Madero; le siguió *F. verticillioides* con 16.7% en Coatepec y 12.5% en Chapingo y Francisco Villa. *F. graminearum* se presentó en todas las localidades; 12.5% en Coatepec y en Santa Lucia; con 8.3% Chapingo, Juchitepec, Francisco I. Madero y Terrenate; 4.2% Nanacamilpa y Francisco Villa. *F. solani* solo se presentó en Nanacamilpa con 4.2% y *F. nivale* en Francisco Villa y Francisco I. Madero con el mismo porcentaje (Figura 18).

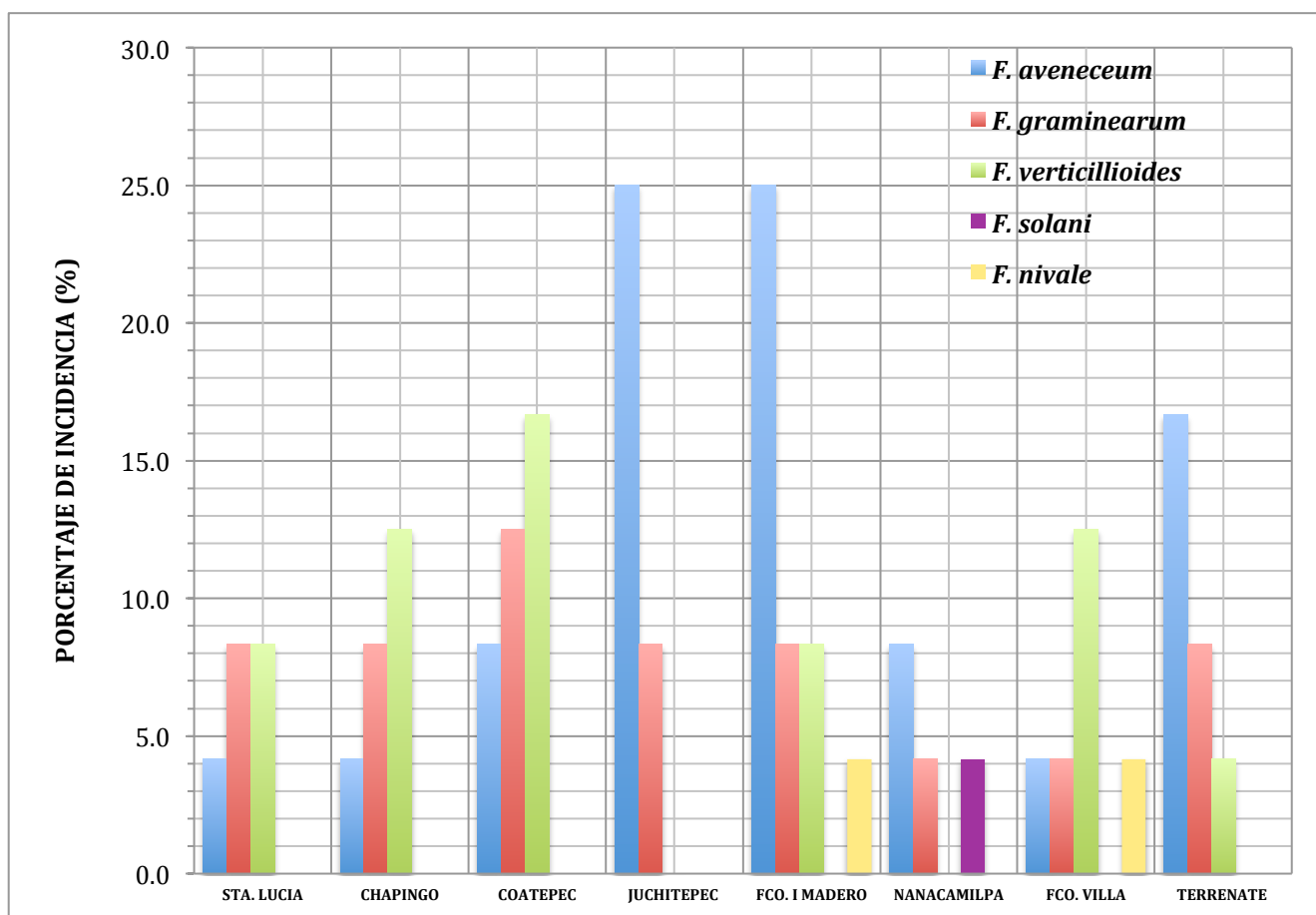


Figura 18. Frecuencia de especies de *Fusarium* aislados de la variedad de trigo Rebeca F2000 del ciclo P/V 2010 de los Valles Altos de México.

Tlaxcala F2000 Ciclo P/V 2010. De igual manera en la variedad Tlaxcala F2000 del ciclo P/V 2010, el hongo de mayor frecuencia en todas las localidades fue *F. avenaceum*; en Juchitepec y Francisco I. Madero con 20.8% y en Nanacamilpa y Terrenate 12.5%. *F. graminearum* también se presentó en todas las localidades, pero con porcentaje menores en Juchitepec 16.7%, Santa Lucia 12.5%, Nanacamilpa y Francisco I. Madero con 8.3%; en Terrenate, Coatepec, Chapingo y Francisco Villa con 4.2%; el porcentaje más alto de *F. verticillioides* fue de 12.5% en Francisco Villa. En Francisco I. Madero se identificó a *F. nivale* con 8.3%, y en esta variedad no se encontró a *F. solani* (Figura 19).

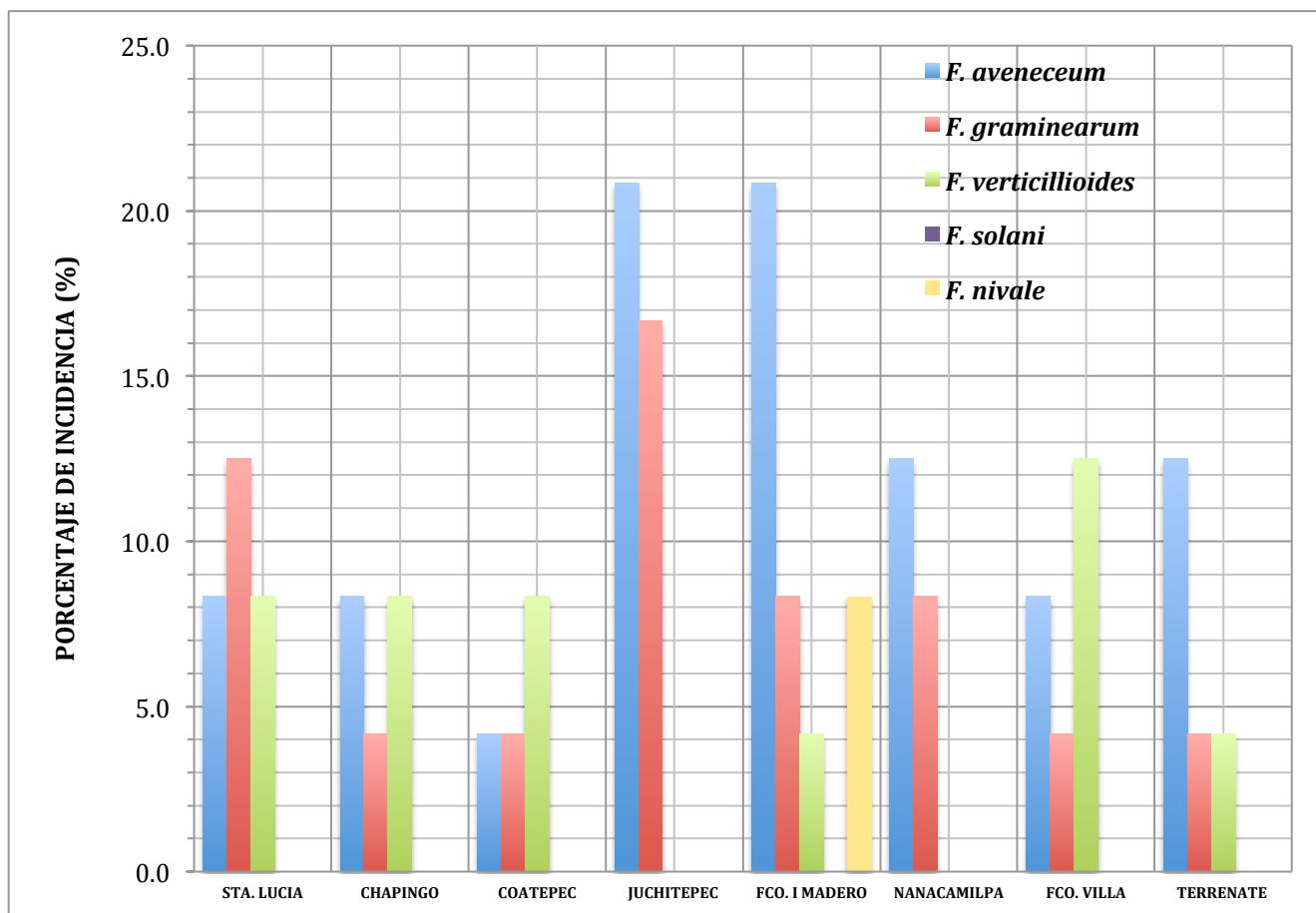


Figura 19. Frecuencia de especies de *Fusarium* aislados de la variedad de trigo Tlaxcala F2000 del ciclo P/V 2010 de los Valles Altos de México.

Rebeca F2000, Ciclo P/V 2011. Nuevamente *F. avenaceum* fue la especie de mayor incidencia 33.3% en la localidad de Texcal, seguida de Santa Lucia con 29.2%, Juchitepec 25%, Tenango del Aire y Nanacamilpa con 20.8% y Jilotepec con 8.3%. A diferencia del ciclo 2010, no se encontró en Chapingo y Coatepec. *F. graminearum* se presentó en todas las localidades; Juchitepec 16.7%, Coatepec 12.5%; en Santa Lucia, Chapingo, Nanacamilpa y Tenango del Aire 8.3% y 4.2% en Texcal y Jilotepec. *F. verticillioides* se reportó en Coatepec 8.3%, Santa Lucia, Juchitepec y Tenango del Aire con 4.2%. *F. solani* se encontró en Chapingo y Jilotepec con 8.3%. *F. nivale* no se encontró (Figura 20).

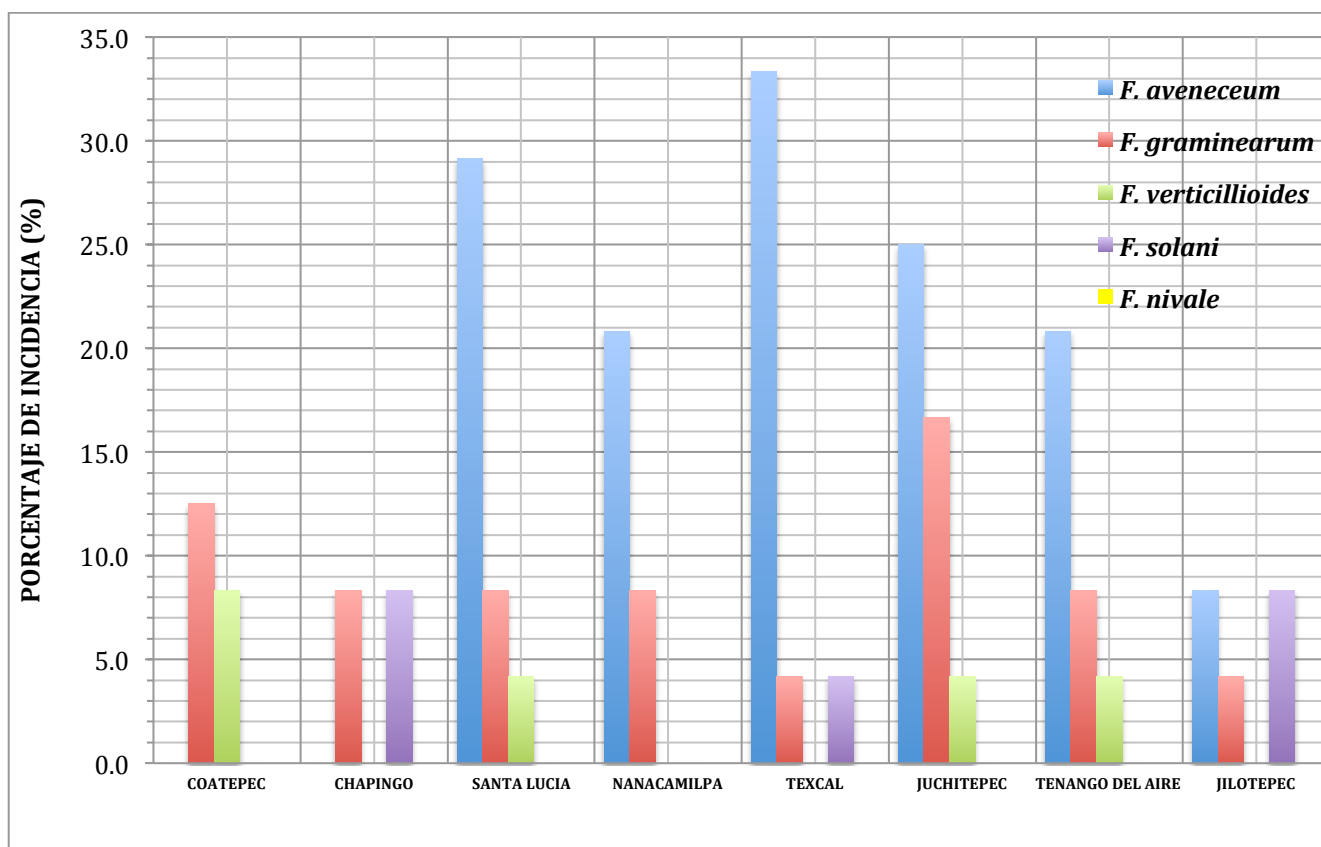


Figura 20. Frecuencia de especies de *Fusarium* aislados de la variedad de trigo Rebeca F2000 del ciclo P/V 2011 de los Valles Altos de México.

Tlaxcala F2000 Ciclo P/V 2011. En el ciclo P/V 2011, *F. avenaceum* fue la especie dominante en las localidades de Juchitepec con 20.8%, Nanacamilpa, Texcal y Tenango del Aire con 16.7%, Jilotepec con 12.5%, Santa Lucia 8.3% y Chapingo 4.2%. *F. graminearum* se manifestó en todas las localidades, Chapingo con 16.7%, Coatepec y Juchitepec con 12.5%, Santa Lucia y Jilotepec con 8.3%, Nanacamilpa, Texcal y Tenango del Aire con 4.2%. *F. verticillioides* reportó 12.5% en Juchitepec, Chapingo 8.3% y Santa Lucia con 4.2%. *F. solani* se presentó en Jilotepec con 8.3% y Tenango del Aire 4.2%. *F. nivale* no se encontró (Figura 21).

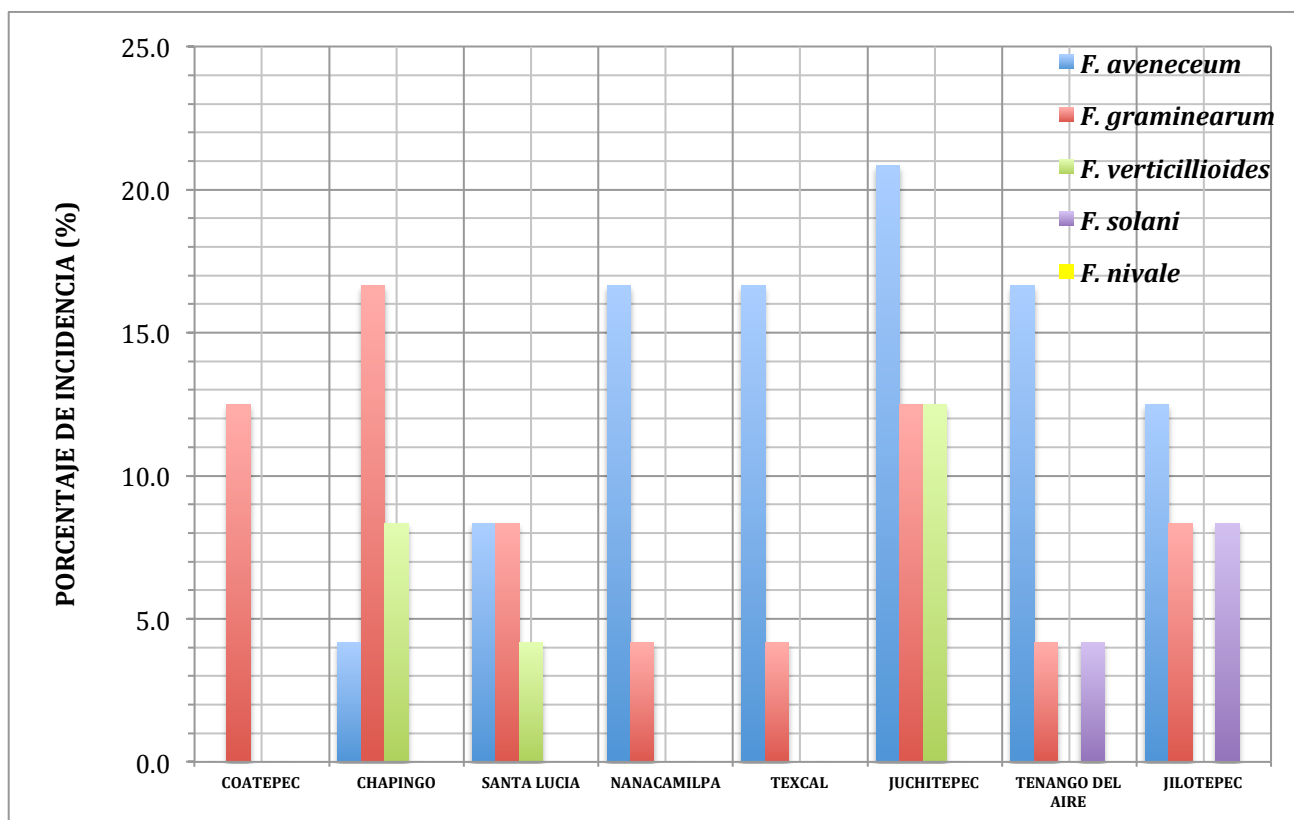


Figura 21. Frecuencia de especies de *Fusarium* aislados de la variedad de trigo Tlaxcala F2000 del ciclo P/V 2011 de los Valles Altos de México.

En las dos variedades de trigo Rebeca F2000 y Tlaxcala F2000 se encontraron las cinco especies de *Fusarium*, en mayor o menor porcentaje; cabe señalar que la variedad más susceptible fue Rebeca F2000. De la misma manera, en los ciclos agrícolas tanto del año 2010 y 2011 *F. avenaceum* fue el patógeno que se encontró con mayor porcentaje de incidencia, seguido de *F. graminearum* y *F. verticillioides*. Las especies de *F. nivale* y *F. solani* se encontraron en menor porcentaje. Las localidades con mayor incidencia fueron Juchitepec, Francisco I. Madero, Nanacamilpa, Santa Lucia y Tenango del Aire, esto se relaciona a las condiciones ambientales que se presentaron (Cuadro 1).

El porcentaje de incidencia de cada una de las cinco especies identificadas varió de acuerdo a las condiciones que prevalecieron en cada localidad, en donde fueron importantes la cantidad de inóculo presente previo a la siembra y las condiciones climatológicas; sin embargo, lo importante es que el presente estudio se desarrolló en 16 ambientes (sitios y/o localidades) que correspondieron al 2010 y 2011 y que invariablemente en cada uno cuando menos se presentaron tres especies de *Fusarium*, lo que indica que es un género con alto potencial de diseminación en las siembras de trigo de temporal en México, ya que vía semilla es uno de los medios más efectivos para diseminarse y causar daños en la producción.

La influencia de las condiciones ambientales para la dispersión de inóculo, como temperatura, humedad, intensidad de la luz y el viento son los factores climáticos críticos que afectan a la producción y dispersión de conidios asexuales y sexuales de las ascosporas de *Fusarium*. Por lo tanto estos factores influyen en la propagación y supervivencia de los hongos. Las condiciones ambientales óptimas para la producción y dispersión del inóculo varían dependiendo de si el hongo se reproduce sexualmente y/o asexualmente (Parry *et al.*, 1995; Leslie y Summerell, 2006), el crecimiento del hongo, la competencia, la producción de micotoxinas y patogenicidad son factores fundamentales para su sobrevivencia (Doohan *et al.*, 2003; Parry *et al.*, 1995). En el cultivo de trigo, los períodos humedad de por lo menos 24 horas y temperaturas superiores a 15 °C son importantes para la infección de las espigas por *Fusarium* spp., (Brennan *et al.*, 2003); estas condiciones prevalecen en localidades de estudio de los Valles Altos de México.

Los datos reportados en las Figuras 18, 19, 20 y 21 señalan la constante presencia de las especies *F. avenaceum*, *F. graminearum* y *F. verticillioides*, lo que representa un riesgo para la salud humana y animal, ya que se reportan micotóxicas de alto grado de toxicidad y pueden permanecer

en los granos almacenados varios años. *F. avenaceum* provoca la síntesis de metabolitos tóxicos incluyendo moniliformina y enniatins, así como beauvericina y enniatin, los cuales se reporta provocan problemas en el sistema respiratorio, digestivo y afectan numerosos órganos y sistemas, en particular el hígado, los riñones y el sistema nervioso, efectos que pueden culminar con cáncer en muchos de los lugares que afectan (Logrieco, 2002; Bottalico, 1998). No menos importantes son los metabolitos que se reportan para *F. graminearum* donde se encuentran zearalenonas, nivalenol, deoxinivalenol y fumonisinas, con efectos similares a los encontrados en los metabolitos de *F. avenaceum* (Magliano and Kikot, 2010; Yoshida y Nakajima, 2010; Nicholson *et al.*, 2004; Marasaset *et al.*, 1984). Finalmente, en daño colateral de las toxinas producidas por *F. verticillioides* como las fumasinas (Fumonisin B1, fumonisin B2, fumonisin B3) que son el grupo de micotoxinas más importantes producidas por *F. verticillioides*, donde algunos aislados pueden producirlas en niveles altos; estudios descritos por diversos autores demuestran numerosos efectos patológicos en animales (Leslie y Summerell, 2006; Whitlow y Hagler, 2005). Chandra *et al.* (2011) encontraron que también produce moniliformina y tricoteceno. En humanos se asocia la presencia de lesiones en la piel a esta especie (Leslie y Summerell, 2006).

VI. CONCLUSIONES

- ✚ Los hongos patógenos identificados en los granos de trigo (*Triticum aestivum* L.) en las diferentes localidades (Santa Lucia, Chapingo, Coatepec, Juchitepec, Francisco I. Madero, Nanacamilpa, Francisco Villa, Terrenate, Texcal, Tenango del aire y Jilotepec) en las variedades (Rebeca F2000 y Tlaxcala F2000) durante los ciclos P/V 2010 y 2011, fueron: *Fusarium avenaceum*, *F. graminearum*, *F. verticilloides*, *F. nivale* y *F. solani*.
- ✚ Las condiciones de humedad y precipitación en los valles altos de México, fueron determinantes en la incidencia de *Fusarium* spp.
- ✚ Especie dominante es *F. avenaceum*, se presentó en todas las localidades y en los dos ciclo agrícolas.
- ✚ La variedad Rebeca F2000 presentó la incidencia mas elevada de *Fusarium* spp. en los granos de trigo de los ciclos agrícolas P/V 2010 y 2011.
- ✚ Debe considerarse darle un tratamiento químico a la semilla o hacer incorporación de microorganismos de biocontrol a los suelos, que permitan inducir al equilibrio en los suelos y reducir la densidad de enfermedades de colonias de *Fusarium* spp.

VII. LITERATURA CITADA

- Agrios, G. N. 2002. Fitopatología. Editorial Limusa. México, D.F. 756 p.
- Ahrens, U., y E. Seemüller. 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma like organisms by polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 15S rRNA gene. *Phytopathology* 82:828-832.
- Bolívar, Z. F. G. *et al.* 2007. Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna. El Colegio Nacional, México D.F. 718 p.
- Booth, C. 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew Surrey. 237p.
- Bottalico, A. 1998. *Fusarium* diseases of cereals: species complex and related mycotoxin profiles, in Europe. *J. Plant Pathol.* 80:85–103.
- Bozzola, J. J. y Lonnie, D. R. 1999. Electron Microscopy. Specimen Preparation for Scanning Electron Microscopy. Jones and Bartlett Publishers. Massachusetts. US. 41-63 p.
- Brennan, J.M. Fagan, B. van Maanen, A. Cooke, B.M. and Doohan, F.M. 2003. Studies on *in vitro* growth and pathogenicity of European *Fusarium* fungi. *European Journal of Plant Pathology* 109: 577–587.
- Caballero, D. M. 2008. Estudio de gran visión y factibilidad económica y financiera para el desarrollo de infraestructura de almacenamiento y distribución de granos y oleaginosas para el mediano y largo plazo a nivel nacional. Informe. 256 pp.
- Chandra N. S.; Wulff, E. G.; Udayashankar, A. C.; Nandini, B. P.; Niranjana, S. R.; Mortensen, C. N. & Prakash, H. S. 2011. Prospects of molecular markers in *Fusarium* species diversity. *Appl Microbiol Biotechnol.* 90:1625–1639.
- Chiarappa, L y Gambogi, P. (1986). Seed pathology and foot production. FAO
- Cook, R. J. y K. F. Baker. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. The American Pathopathological Soc. St. Paul, Minnesota. 539p.
- Cook, R. J. y W. C. Snyder. 1965. Influence of host exudates on growth and survival of germings of *Fusarium solani* f. sp. *Phaseoli* in soil. *Phytopathology* 55: 1021-1025.
- Desjardins, A. E., 2006. *Fusarium* mycotoxins. Chemistry, Genetics, and Biology. The American Phytopathological Society. APS Press, St. Paul, Minnesota U.S.A.

- Desjardins, A.E and Proctor, R. H. 2007. Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. *International Journal of Food Microbiology* 119: 47–50.
- Dubin, H.J., Gilchrist, L. Reeves, J. 1996. *Fusarium* Head Scab: Global Status and Future Prospects. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y trigo. CIMMYT. El Batán, México. 129p.
- Doohan, F.M., Brennan, J. and Cooke, B.M.2003. Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals. *European Journal of Plant Pathology* 109: 755–768.
- FAOSTAT | © FAO Dirección de Estadística 2011 | 07 enero 2013
- Fernandez, M. R., and Chen, Y. 2005. Pathogenicity of *Fusarium* species on different plant parts of spring wheat under controlled conditions. *Plant Dis.* 89:164-169.
- Gabor, B. and Wiebe, W. 1997. *Enfermedades del tomate*. Siminis vegetales sedes. Inc. Saticoy, California. USA.
- García, E. 1988. Modificación del sistema de clasificación climática de Koppen. 4a. ed. México, D.F. 239 p.
- Gilchrist-Saavedra, L., G. Fuentes-Dávila, C. Martínez-Cano, R.M. López-Atilano, E. Duveiller, R.P. Singh, M. Henry e I. García A. 2005. Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada. Segunda edición. México, D.F.: CIMMYT.
- González, R. V., Ruiz G. O., García I. E. y Vega G. M. 2005. Aplicaciones de la Biotecnología en Seguridad Alimentaria. Agencia Española de Seguridad Alimentaria /Fundación Española para el Desarrollo de la Investigación en Genómica y Proteómica. 94 pp.
- Goswami, R. S., y Kistler, H. C. 2005. Pathogenicity and in planta mycotoxin accumulation among members of the *Fusarium graminearum* species complex on wheat and rice. *Phytopathology* 95:1397-1404.
- Hajieghrari B. 2009. Wheat crown and root rotting fungi in Moghan area, Northwest of Iran. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 8 (22) 6214-6219.
- Hutton, D. G., R. E. W. y W. F. M. 1973. Effect of two plant parasitic nematodes on *Fusarium* dry root rot of beans. *Phytopathology*. 152 p.
- INEGI. Instituto Nacional de Estadística y Geografía, consultado el 20 de marzo del 2013 en la página <http://www.inegi.org.mx>
- Ireta M., J. y L. Gilchrist. 1994. Roña o tizón de la espiga del trigo (*Fusarium graminearum* Sch.).

- Knoll, S., Mulfinger, S., Niessen, L. and Vogel, R. F. 2002. Rapid preparation of *Fusarium* DNA from cereals for diagnostic PCR using sonification and an extraction kit. *Plant Pathology* 51:728–734.
- Kvas, M., Marasas, W.F.O., Wingfield, B.D., Wingfield, M.J. and Steenkamp, E.T. (2009). Diversity and evolution of *Fusarium* species in the *Gibberella fujikuroi* complex. *Fungal Diversity* 34: 1-21.
- Lawrence, E. O. y Jeffrey, M. S. 2007. Epidemiology of *Fusarium* head blight on small-grain cereals. *International Journal of Food Microbiology*. 119:103–108.
- Leslie, J. F. y Summerell, B. A. 2006. *The Fusarium*. Laboratory manual. Ed. Blackwell Publishing, State Iowa, USA. 740 p.
- Leyva M. G., González, I. R. M., 2000. Descripción y control de tizones, manchas foliares y roña de la espiga del trigo. *En: Villaseñor M., H.E., Espitia R., E. 2000. El Trigo de Temporal en México, Instituto nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. 313p. (Libro técnico No. 1).*
- Logrieco, A.; Rizzo, A.; Ferracane, R. and Ritieni, A. 2002. Occurrence of Beauvericin and Enniatins in Wheat Affected by *Fusarium avenaceum* Head Blight. *Appl. Environ. Microbiol*, 68(1):82-85.
- Magliano, A. T. and Kikot, G. E. 2010. Microscopy techniques to analyse plant-pathogen interaction: *Fusarium graminearum* as pathogen of wheat. *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education*.
- Makoto K.; Naoko, T.; Takumi, N.; Shuichi, O.; Takeshi, T.; Noriyuki, O.; Makoto, F.; Toshiaki, K.; Hiroshi, H.; Isamu, Y. 2006. Molecular biology and biotechnology for reduction of *Fusarium* mycotoxin contamination. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 86:117–123.
- Marasas, W. F. O., Nelson, P. E., Toussoun, T. A. 1984. *Toxigenic Fusarium Species: Identity and Mycotoxicology*. Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania, USA. 328 p.
- Martin, R. R., James, D., y Levesque, C. A. 2000. Impacts of molecular diagnostic technologies of plant disease management. *Annu. Rev. Phytopathology*. 38: 207- 239.
- Moreno, M. 1988. *Manual para la Identificación de Hongos en Granos y sus Derivados*. Universidad Nacional Autónoma de México. 1a. edición. México. pp. 9-104.
- Pfenning, H. L. y Magalhães de Abreu, Lucas. 2012. Hongos del suelo saprófitos y patógenos de plantas. *En: Moreira, F., Huisling, E. J. y Bignell. 2012. Manual de Biología*

- de suelos tropicales. Muestreo y caracterización de la biodiversidad bajo suelo. Instituto Nacional de Ecología, México, 337 p.
- Nyvall, R. F. 1999. Field Crop Diseases. Third Ed. Iowa State University Press/Ames. 1021 p.
 - Nelson PE, Tousson TA, Cook R, eds 1981. *Fusarium: Disease, Biology and Taxonomy*. Pennsylvania University Park, USA and London, UK: Pennsylvania State University Press.
 - Nicholson, P.; Simpson, D.R.; Wilson, A.H.; Chandler E. and Thomsett, M. 2004. Detection and differentiation of tricothecene and enniatin-producing *Fusarium* species on small-grain cereals. *European Journal of Plant Pathology* 110: 503-514.
 - Ojeda, S. J. L. 1997. Métodos de Microscopía de Barrido en Biología. Santander: Universidad de Cantabria, D. L. España. 50 p.
 - Ooka, J. J., y Kommedahl, T. 1977. Wind and rain dispersal of *Fusarium moniliforme* in corn fields. *Phytopathology* 67:1023-1026.
 - Peña Bautista, R. J., Perez Herrera, P., Villaseñor Mir H. E., Gomez Valdez, M.M., Mendoza Lozano, M. A . 2008. CaUdad de fa cosecha de (riga en Mexico. Cicio primavera-verano 2006. Publicacion Especial del CONASIST-CONATRIGO, Tajin No. 567, Col. Vertiz Narvarte, Delegacion Benito Juarez c.P. 03600 Mexico, D.F. 28p.
 - Parry, D. W.; Jenkinson, P.; Mcleod L. 1995. *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals. *Plant Pathology* 44: 207-238.
 - Pingali, P. L. 1999. CIMMIYT 1998-99 World Factors and Trends. Global Wheat Research in a Changing World: challenges and Achievements. México, D.F., México, Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. 46 p.
 - Prandini, A.; Sigolo S.; Filippi, L.; Battilani, P.; Piva G. 2009. Review of predictive models for *Fusarium* head blight and related mycotoxin contamination in wheat. *Food and Chemical Toxicology* 47:927–931
 - Presscot, J. M.; Burnett, P. A.; Saari, Ransom; J. Browman, J. W. y Williano, Sing, R. P., Bekele, G. 1986. Enfermedades y plagas de trigo: Una guía para su identificación de campo. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. México, DF. 135 p.
 - Prescontt, M.L.; Harley, P. J Y Kein, A. D. 2002. Microbiología. Mcgraw-Hill-Interamericana De España, S. A. U. 349 p.
 - Rossi, V., Giosuè, S., Girometta, B., Cigolini, M., 2004. Dynamic simulation of *Fusarium* Head Blight epidemics. In: S.M. Canty, T. Boring, J. Wardwell, R.W. Ward (Eds.),

- Proceedings of the Second International Symposium on Fusarium Head Blight; incorporating the Eighth European Fusarium Seminar, 11–15 December 2004, Orlando, FL, USA. East Lansing, MI, Michigan State University, vol. 2, pp. 494–496.
- Saharan, M. S.; Kumar, J; Sharma, A. K. and Nagarajan, S. Fusarium Head Blight (FHB) or Head Scab of Wheat-A review. 2004. Proc. Indian Natl. Sci. Acad. B70 No. 3 255-268 pp.
 - Santoyo C. E y Quiroz M. J. 2004. Guía para el cultivo de cereales en el Estado de México. Instituto de Investigación y Capacitación Agropecuaria, Acuícola y Forestal del Estado de México, ICAMEX. Metepec, Estado de México. Folleto técnico. 22 p.
 - SIAP| Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, México-©-2012 |24 Junio 2013.
 - Snijders, C. H. A.; Samson, R. A.; Hoekstra, E. S.; Ouellet, T.; Miller, J. D; de Rooij van der Goes P. C.; Barr, A. J. M.; Dubois, A. E. J. and Kauffman, H. F. 1996. Analysis of *Fusarium* causing dermal toxicosis in marram grass planters. *Mycopathologia* 135: 119-128.
 - Stubbs, R., Prescott J., Saari E. y Dubin H. 1986. Manual de Metodología Sobre las Enfermedades de los Cereales. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). México. pp. 1-46.
 - Turner A. S.; Lees A. K.; Rezanoor H. N. and P. Nicholson. 1998. Refinement of PCR-detection of *Fusarium avenaceum* and evidence from DNA marker studies for phenetic relatedness to *Fusarium tricinctum*. *Plant Pathology* 47: 278–288
 - Villaseñor, M. H. E. y Espitia R. E. 2000. El Trigo de Temporal en México. Libro Técnico No 1. Chapingo, Estado de México., México, SAGAR, INIFAP, CIRCE, Campo Experimental Valle de México. 315 p.
 - Villaseñor M. H. E., Espitia R. E., Huerta E. J., González I. R., María R. A., 2000a. REBECA F2000 nueva variedad de trigo para siembras en temporales lluviosos y medio lluviosos en México. INIFAP, Campo Experimental Valle de México. 21 p. (Folleto técnico No. 4).
 - Villaseñor M. H. E.; Espitia R. E.; Huerta E. J.; María R. A., Osorio A. L.; Aguirre M. D. 2000b. TLAXCALA F2000 nueva variedad de trigo para siembras en temporales en México. INIFAP, Campo Experimental Valle de México. 24 p. (Folleto técnico No. 1).
 - Wagacha, J.M. and Muthomi, J.W. 2007. *Fusarium culmorum*: Infection process, mechanisms of mycotoxin production and their role in pathogenesis in wheat. *Crop*

- Wang, Y.Z. y J.D. Miller. 1988a. Screening techniques and sources of resistance to *Fusarium* head blight. En: Wheat production constraints in tropical environments. A. Klatt (ed.). México, D.F.: CIMMYT.
- Warham, E.J., Butler L. y Sutton B. 1998. Ensayos para la Semilla de Maíz y de Trigo. Manual de Laboratorio. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). México. 64 p.
- Watson, L.P.; McKee, A.E.; Merrell, B.R. 1980. Preparation of microbiological specimens for scanning electron microscopy. Scan Electron Microsc. 1980; (Pt 2):45-56.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White, Eds.), pp. 315–322. Academic Press, San Diego.
- Whitlow, L.W., Hagler, W.M., 2005. Mycotoxins in feeds. Feedstuffs 14, 69–79.
- Wiese, M.V. 1987. Compendium of Wheat Diseases. American Phytopathological Society APS Press, St Paul, Minesota, USA. 124 p.
- Wilke, A. L., Bronson, C. R., Tomas, A., and Munkvold, G. P. 2007. Seed transmission of *Fusarium verticillioides* in maize plants grown under three different temperature regimes. Plant Disease. 91:1109-1115.
- Wright, D. G.; Thomas, G. J.; Loughman, R.; Fuso-Nyarko, J. and Bullock, S. 2010. Detection of *Fusarium graminearum* in wheat grains in Western Australia. Australasian Plant Disease Notes. 5:82–84
- Xu, X.-M.; Monger, W.; Ritieni, A. and P. Nicholson. 2007. Effect of temperature and duration of wetness during initial infection periods on disease development, fungal biomass and mycotoxin concentrations on wheat inoculated with single, or combinations of, *Fusarium* species. Plant Pathology 56: 943–956.
- Yoshida, M., and Nakajima, T. 2010. Deoxynivalenol and nivalenol accumulation in wheat infected with *Fusarium graminearum* during grain development. Phytopathology 100:763-773.
- Zyllinsky F., J. 1984. Guía para la identificación de enfermedades en cereales de grano pequeño. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y trigo. CIMMYT. México, D.F. 141p.