

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *Fusarium* spp. CAUSANTES DE LA ROÑA DE LA
ESPIGA DE TRIGO (*Triticum aestivum* L.) EN VALLES ALTOS DE OAXACA.

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL



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

PRESENTA:

MARIO ZARAGOZA VARGAS



Junio de 2015, Chapingo, México

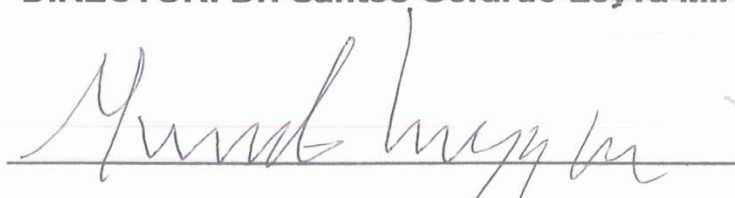
**IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *Fusarium* spp. CAUSANTES DE LA
ROÑA DE LA ESPIGA DE TRIGO (*Triticum aestivum* L.) EN VALLES ALTOS
DE OAXACA.**

**Tesis realizada por Mario Zaragoza Vargas 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 PROTECCION VEGETAL

COMITÉ

DIRECTOR: Dr. Santos Gerardo Leyva Mir



CO-DIRECTOR: Dr. Eduardo Villaseñor Mir



ASESOR: Dr. Cristian Nava Díaz



**ASESOR: Dra. Magnolia Moreno
Veíázquez**



Chapingo, México, Junio 2015

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo económico brindado durante la realización de mis estudios de maestría.

A la Universidad Autónoma Chapingo, por ser mi alma mater, por haberme brindado la oportunidad de estudiar y llegar hasta este punto de mi vida.

Al Dr. Santos Gerardo Leyva Mir, por brindarme su apoyo en la realización de esta investigación. Por los conocimientos adquiridos gracias por su amistad y confianza.

A la Dra. Magnolia Moreno Velázquez, por las asesorías brindadas durante el experimento de esta tesis, gracias por su apoyo y valiosa aportación en la realización y revisión del presente trabajo..

Al Dr. Héctor Eduardo Villaseñor Mir, por su apoyo y por el material proporcionado para la realización de mi trabajo de investigación.

Al Dr. Cristian Nava Díaz, por su valiosa aportación en la realización del presente trabajo.

A la M.C. Edith Angélica Gutiérrez Tlahque por su valiosa aportación en la culminación de éste trabajo.

Al M.C. Luis Emilio Castillo Márquez por su valiosa aportación en el análisis de los resultados del presente trabajo.

A Marianita y al Sr. Juanito del Laboratorio de Micología del Departamento de Parasitología Agrícola, por brindarme el material necesario para mi trabajo de investigación.

Se reconoce el apoyo financiero brindado por el Fondo Sectorial SAGARPA-CONACYT a través de proyecto titulado: SISTEMAS DE MEJORAMIENTO GENÉTICO PARA GENERAR VARIEDADES RESISTENTES A ROYAS, DE ALTO RENDIMIENTO Y ALTA CALIDAD PARA UNA PRODUCCIÓN SUSTENTABLE DE TRIGO EN MÉXICO, No. 146788.

DEDICATORIAS

A mis padres:

La Sra. Rita Vargas Martínez y el Sr. José Zaragoza Hernández, por apoyarme a lo largo de mis estudios, por brindarme siempre su confianza y amor, les dedico éste gran logro de mi vida, el cual sin la educación que me brindaron en su hogar, no hubiese obtenido, **LOS AMO.**

A mis hermanitos:

Gaby, Lole y Lalito porque a pesar de que hace mucho tiempo no estamos juntos siempre han estado a mi lado apoyándome, **LOS QUIERO.**

A mi hermosa esposa Edith Angélica. Gutiérrez Tlahque y mi pequeño Bryan Peralta Gutiérrez por ser una motivación de mi vida, mi inspiración, la razón del querer superarme día a día, **LOS AMO.**

Con cariño..... Mazvar

DATOS BIOGRÁFICOS

Datos generales:

Nombre: Mario Zaragoza Vargas

Fecha de nacimiento: 07 de Marzo de 1985.

Lugar de origen: Irapuato, Gto.

Profesión: Ingeniero Agrónomo Especialista en Parasitología Agrícola.

Formación académica:

Preparatoria: Preparatoria Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo (2000-2004).

Licenciatura: Departamento de parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo (2004-2007).

El tema del trabajo de investigación con el cual obtuvo el título de Ingeniero Agrónomo Especialista en Parasitología Agrícola fue: "Identificación por PCR del agente causal de la podrición de la raíz de "belén" (*Impatiens* sp.) en Cuernavaca, Morelos."

Maestría en Ciencias: Programa en Protección Vegetal del Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo (2013-2014).

CONTENIDO

INDICE GENERAL	PÁGINAS
ÍNDICE DE FIGURAS.....	i
INDICE DE CUADROS.....	ii
RESUMEN.....	iii
ABSTRACT.....	iii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVO.....	2
3. HIPÓTESIS.....	2
4. REVISIÓN DE LITERATURA.....	2
4.1 Enfermedades ocasionadas por <i>Fusarium</i> spp.....	2
4.1.1. Micotoxinas de <i>Fusarium</i> spp.....	3
4.1.2 <i>Gibberella zeae</i> Schw (<i>Fusarium graminearum</i> Schwabe)	4
4.1.2.1. Síntomas.....	4
4.1.2.2. Morfología.....	5
4.1.2.3. Biología y Epidemiología.....	5
4.1.2.4. Hospedantes.....	6
4.1.3. <i>Gibberella moniliformis</i> Wineland. (<i>Fusarium verticillioides</i> (Saccardo) Nirenberg).....	6
4.1.3.1. Importancia.....	6
4.1.3.2. Síntomas.....	7
4.1.3.3. Morfología.....	7
4.1.3.4. Biología y Epidemiología.....	8
4.1.3.5. Hospedantes.....	8
4.1.4. <i>Gibberella avenacea</i> Cook (<i>Fusarium avenaceum</i> (Fries) Saccardo).....	8
4.1.4.1. Síntomas.....	8
4.1.4.2. Morfología.....	8
4.1.4.3. Biología y epidemiología.....	9
4.1.4.4. Hospedantes.....	9
4.1.5. <i>Fusarium culmorum</i> (W.G. Smith) Saccardo.....	10
4.1.5.1. Síntomas.....	10
4.1.5.2. Morfología.....	10
4.1.5.3. Biología y Epidemiología.....	10
4.1.5.4. Hospedantes.....	11

4.1.6. <i>Fusarium equiseti</i> (Corda) Saccardo	11
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
5.1. Sitio de muestreo.....	12
5.2.- Municipios donde se realizó el muestreo	12
5.2.1. Santiago Tillo.....	13
5.2.2. San Andrés Sinaxtla.....	13
5.2.3. Santo Domingo Yanhuatlán	13
5.2.4. San Bartolo Soyaltepec.....	13
5.3. Variedades Muestreadas.....	13
5.3.1. Altiplano F2007	14
5.3.2. Nana F2007.....	14
5.3.3. Rebeca F2000.....	14
5.4. DETERMINACIÓN DE INCIDENCIA Y SEVERIDAD DE ROÑA DE LA ESPIGA EN LAS MUESTRAS COLECTADAS.....	15
5.4.1. Aislamiento de <i>Fusarium</i> spp.....	16
5.4.1.1. Método de Papel Secante y Congelación (Freezing Blotter).....	16
5.4.1.2. Aislamiento y purificación	17
5.5. Caracterización morfológica.....	18
5.6. Caracterización molecular.....	18
5.6.1. Extracción de DNA.....	19
5.6.2. PCR y secuenciación.....	19
5.7. Diseño experimental.....	20
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
6.1. Incidencia y severidad de roña de la espiga.	20
6.1.1. Análisis estadístico, para incidencia y severidad en espiga.....	21
6.2. Caracterización morfológica	22
6.2.1. <i>Fusarium graminearum</i>	23
6.2.2. <i>Fusarium temperatum</i>	24
6.2.3. <i>Fusarium verticilloides</i>	25
6.2.4. <i>Fusarium equiseti</i>	26
6.2.5. <i>Fusarium oxysporum</i>	27
6.2.6. Incidencia de <i>Fusarium</i> spp en granos de trigo.....	28
6.3. Análisis estadístico, para incidencia de <i>Fusarium</i> spp en granos de trigo.....	29
6.4. Identificación Molecular.....	32

6.5 Discusión.....	33
7.- CONCLUSIONES.....	34
8. BIBLIOGRAFÍA.....	35

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. a) Espigas que comprendían una muestra; b) Espiga con daño.....	16
Figura 2. a) Granos de trigo en cajas transparentes; b) Esporulación de los hongos en grano.....	17
Figura 3. a) Aislamiento del hongo en nuevas cajas de PDA; b) Conservación del hongo en tubos con PDA y aceite.....	18
Figura 4. Morfología de <i>Fusarium graminearum</i> . A) Colonia en granos de trigo; B y C) Crecimiento de la colonia en medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA); D, E y F) Macroconidios célula basal en forma de pie y célula apical curva muy puntiaguda (100X).....	24
Figura 5. Morfología de <i>Fusarium temperatum</i> . A) Crecimiento de la colonia en los granos de trigo; B) Crecimiento aéreo de la colonia en PDA, micelio aéreo algodonoso con una coloración rosa; superficie de la colonia en PDA, color violeta; C) Macroconidios hialinos falcados. D) Microconidios de ovales a ovoides en falsas cabezas (100X).....	25
Figura 6. Morfología de <i>Fusarium verticilloides</i> . A) Crecimiento de la colonia en los granos de trigo; B) Crecimiento aéreo de la colonia en PDA, micelio algodonoso blanquecino a rosáceo; C) Pigmentación en el medio PDA, color violeta; D y E) microconidios en largas cadenas (100X).....	26
Figura 7. Morfología de <i>Fusarium equiseti</i> . A) Crecimiento de la colonia en los granos de trigo; B) micelio, con coloración blanca; B) Pigmentación en el medio PDA, color blanca a café; D) Macroconidios muy largos con célula basal en forma de látigo (100X).....	27
Figura 8. Morfología de <i>Fusarium oxysporum</i> . A) Crecimiento de la colonia en los granos de trigo color blanco; B) Micelio algodonoso de escaso a abundante, con coloración de blanca a violeta, pigmentación en el agar color purpura; C) Monofialides cortas; D) Macroconidios con 3 septos y microconidios aceptados (100X).....	28

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Sitios donde se llevó a cabo el muestreo	12
Cuadro 2. Incidencia y severidad de roña de la espiga, en las muestras.....	21.
Cuadro 3. Análisis de incidencia de roña de la espiga por variedad, en espiga.....	21
Cuadro 4. Análisis de severidad de roña de la espiga por variedad, en espiga.....	22
Cuadro 5. Análisis de severidad de roña de la espiga por municipio, en espiga.....	22
Cuadro 6. Características de las colonias de aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. desarrolladas en medio de cultivo papa dextrosa agar.....	23
Cuadro 7. Incidencia de <i>Fusarium</i> spp. en las localidades de los Valles altos de Oaxaca en el ciclo de producción Primavera-Verano de 2013.....	29
Cuadro 8. Análisis de incidencia de <i>Fusarium</i> spp por variedad, en granos.....	29
Cuadro 9. Análisis de incidencia de <i>Fusarium</i> spp por municipio, en granos.....	30
Cuadro 10. Incidencia de <i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. temperatum</i> , <i>F. verticilloides</i> , <i>F. equiseti</i> y <i>F. oxysporum</i> en granos de trigo en las 9 muestras de los Valles Altos de Oaxaca en el ciclo de producción Primavera-Verano de 2013.....	30
Cuadro 11. Análisis de la incidencia de <i>F. graminearum</i> en grano por variedades.....	31
Cuadro 12. Análisis de la incidencia de <i>F. temperatum</i> en grano por variedades.....	31
Cuadro 13. Análisis de la incidencia de <i>F. verticilloides</i> en grano por variedades.....	31
Cuadro 14. Análisis de la incidencia de <i>F. equiseti</i> en grano por variedades.....	31
Cuadro 15 Análisis de la incidencia de <i>F. oxysporum</i> en grano por variedades.....	31
Cuadro 16. Resultados de la identificación molecular de <i>Fusarium</i> spp. con los primers ITS4/ITS5 y EF-1/EF-2	32

IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *Fusarium* spp. CAUSANTES DE LA ROÑA DE LA ESPIGA DE TRIGO (*Triticum aestivum* L.) EN VALLES ALTOS DE OAXACA.

IDENTIFICATION OF *Fusarium* spp. SPECIES CAUSING THE SCAB OF WHEAT (*Triticum aestivum* L.) IN HIGHLANDS OF OAXACA.

M. Zaragoza-Vargas¹ y S. G. Leyva-Mir²

RESUMEN

La roña de la espiga de trigo, el tizón de plántulas y pudrición del pie de los cereales son enfermedades importantes en el mundo, ocasionan 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. en la zona productora de los Valles Altos de Oaxaca, en las variedades Rebeca F2000, Nana F2007, Altiplano F2007, Criollo Venturero y Pavón. Se aisló a *Fusarium* spp. de semilla de trigo del ciclo Primavera-Verano (P/V) 2013 de un muestreo al azar y se identificaron las especies a través de técnicas moleculares y morfológicas. Los resultados permitieron identificar a cinco especies, las más frecuentes fueron *F. graminearum*, *F. temperatum*, y *F. verticillioides*, en menor porcentaje *F. equiseti* y *F. oxysporum*. Las técnicas moleculares (PCR) confirmaron las especies de *Fusarium* amplificando dos regiones del genoma, una de estas regiones corresponde a los espaciadores internos transcritos o ITS, además de los genes que codifican para el factor de elongación. 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*, micotoxinas, calidad, rendimiento.

ABSTRACT

The scab of wheat, seedling blight and stem rot base of cereals are important diseases worldwide, causing severe losses in grain yield and decrease industrial quality, sick kernels can contain harmful mycotoxins for humans and animals. *Fusarium* is the causal agent, but we need to know which species attack grain of wheat in Mexico; so the objective of this work was to quantify the incidence of *Fusarium* spp. in the production areas of the highlands of Oaxaca, in Rebeca F2000, Nana F2007, Altiplano F2007, Criollo Venturero and Pavon varieties. *Fusarium* spp. from a random sampling of wheat seed during the Spring-Summer cycles (P/V) 2013 was isolated and species were identified using molecular and morphological techniques. The results allowed to identify five species, *F. graminearum*, *F. temperatum* and *F. verticillioides*, were the most frequent, and, *F. equiseti* and *F. oxysporum*, in lesser percentage. The Molecular techniques (PCR) allowed to confirm *Fusarium* species amplifying two regions of the genome, these regions correspond to the internal transcribed spacers or ITS, furthermore the coding genes for the elongation factor. The presence and spread of *Fusarium* spp. is related to environmental and genetic conditions of the plant material; which can be related to this work results.

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

¹ Tesista

² Director

1. INTRODUCCIÓN

El trigo (*Triticum aestivum* L.) es el cultivo más importante a nivel mundial, ocupa el primer lugar en superficie y producción, su grano aporta la mayor parte de los carbohidratos en la alimentación humana (Stubbs *et al.*, 1986). Se siembra en alrededor de 75 países, figurando entre ellos México; su producción mundial es alrededor de 579 millones de toneladas (Villaseñor, 2000).

En México en 2013 se sembraron alrededor de 680, 000 has de trigo con una producción de 3, 350, 000 toneladas aproximadamente; los estados más importantes fueron, bajo el sistema de riego: Sonora, Guanajuato, Baja California, Michoacán y Chihuahua, mientras que bajo temporal, destacó la región de Valles Altos de México (Tlaxcala y Estado de México) con 33,806 has, Nuevo león con 15,333 has y Oaxaca en tercer lugar con 14,832 has. (SIAP, 2014).

La fusariosis o roña de la espiga de trigo, el tizón de plántulas y la pudrición del pie de los cereales son enfermedades importantes en el mundo, ocasionan pérdidas severas en rendimiento de grano y merman la calidad industrial, además de que los granos enfermos pueden contener micotoxinas dañinas para el ser humano y los animales. Moedano (2013), indicó que el agente causal de la roña de la espiga es *Fusarium*. A su vez, Kvas, *et al.* (2009), Goswami, *et al.* (2005), Walg (1988), Gilchrist *et al.* (2005) e Ireta M. (1994), han precisado que en las zonas trigueras de temporal de México se han aislado e identificado hasta 18 especies de *Fusarium* dentro de las cuales destacan *F. graminearum*, *F. avenaceum*, *F. nivale*, *F. verticilloides*, *F. solani* y *F. equiseti*.

En el año 2013 las condiciones de alta humedad que prevalecieron en la zona de Valles Altos de Oaxaca, a causa de las lluvias provocadas por el huracán “Ingrid” y la tormenta “Manuel”, brindaron las condiciones óptimas para la aparición de la roña de la espiga del trigo, por lo que la producción comercial del ciclo P-V 2013 se vio fuertemente afectada, con pérdidas de hasta el 100%, así mismo los materiales genéticos de INIFAP también sufrieron esas mismas pérdidas (Leyva, 2013, comunicación personal).

Dado que en la región de Valles Altos de Oaxaca no se cuentan con estudios para determinar las especies asociadas a la enfermedad denominada roña de la espiga, que permitan diseñar un manejo específico del cultivo para la prevención y control de la enfermedad, se decidió desarrollar el presente trabajo.

2. OBJETIVO

- Cuantificar la incidencia de *Fusarium* en trigo de la zona productora de los Valles Altos de Oaxaca y determinar morfológica y molecularmente las diferentes especies asociadas a la roña de la espiga.

3. HIPOTESIS

- En las zonas trigueras de temporal de México se han reportado las especies *Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. nivale*, *F. equiseti*, *F. verticilloides*, y *F. solani*, por lo que se considera posible que alguna(s) de estas especies está(n) asociada(s) a los síntomas de la roña de la espiga de trigo en Valles Altos de Oaxaca.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1. Enfermedades ocasionadas por *Fusarium* spp.

La mayoría de las especies del género *Fusarium* habitan en el suelo y pueden ser parásitos facultativos, lo cual favorece la sobrevivencia del patógeno en los campos de cultivo, pues persisten en forma de micelio o formando estructuras especializadas sobre los residuos vegetales y cuando las condiciones meteorológicas son favorables para su desarrollo, especialmente en la etapa de floración de los vegetales hospederos, los conidios son dispersados por el viento o por salpique de las gotas de lluvia o insectos presentes en las plantas, e inicia el proceso de infección (Nicholson *et al.*, 2007)

Las dos enfermedades comunes de los cereales causadas por *Fusarium* spp. son pudriciones de la raíz y roña o fusariosis de la espiga. La roña o tizón de la espiga del trigo fue reportada por primera vez en Inglaterra alrededor de 1884 y es importante en áreas cálidas y húmedas (Dubin *et al.*, 1996); 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. Esta enfermedad puede causar caída y marchitez de plántulas, pudrición de la corona, tizón de los nudos y de los tallos, y pudrición del grano. Los granos infectados están chupados y no son viables, además que pueden contener micotoxinas nocivas para los humanos y animales. (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: conidios pequeños llamados microconidios, que pueden o no estar presentes, y conidios grandes llamados macroconidios, que son producidos por todas las especies, con características morfológicas específicas por especie. Para la identificación y diferenciación a nivel de especie, entre otras características se debe considerar la ausencia o presencia de microconidios y las características específicas de tamaño, forma y número de células de los macroconidios (Zyllinsky, 1984).

4.1.1. Micotoxinas de *Fusarium* spp.

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. (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 o durante la cosecha, durante el transporte, el procesamiento o el almacenamiento. 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 (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).

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

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).

4.1.2.1. 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 ascosporas 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.

4.1.2.2. 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).

4.1.2.3. 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 zeae*, 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).

4.1.2.4. 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* (LK.) 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).

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

4.1.3.1. 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).

4.1.3.2. 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).

4.1.3.3. 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).

4.1.3.4. 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).

4.1.3.5. 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).

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

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).

4.1.4.1. 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).

4.1.4.2. 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 esporodocios 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 fusoide con 1 a 2 septos, pueden variar en tamaño y se presentan generalmente solos. Las células conidiógenas puede presentarse en monofialides o polifialides (Leslie y Summerell, 2006).

4.1.4.3. Biología y epidemiología

El desarrollo de esta enfermedad se favorece por condiciones cálidas y húmedas durante y después del espigamiento (Zillinsky, 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).

4.1.4.4. 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).

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

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).

4.1.5.1. 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).

4.1.5.2. 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).

4.1.5.3. 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 más importante (Wagacha y Muthomi, 2007).

4.1.5.4. 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).

4.1.6. *Fusarium. equiseti* (Corda) Saccardo

Es una especie que se presenta frecuentemente como un hongo del suelo, constituyendo una alta proporción de la microflora en algunas áreas. Sin embargo, no se considera como un patógeno serio de los cultivos cerealícolas (Zillinsky, 1984; Vargas, 2006).

Los esporodoquios son color naranja. Los macroconidios en los esporodoquios por lo general son uniformes en forma y tamaño y deben ser utilizados para fines de identificación de este hongo. Estos macroconidios son largos o muy largos y delgados. Los macroconidios han formado una curvatura dorsiventral típica. La célula apical es cónica y alargada o incluso llega a tener forma de látigo. La célula basal tiene una forma de pie prominente que puede ser alargada en apariencia. Genera de 5 - a 7 septas midiendo de 50-100µm × 3.5-6.0µm. Esta especie genera abundantes esporodoquios (Leslie y Summerell, 2006).

Es un habitante del suelo cosmopolita y es efectivo en colonizar las raíces de plantas en unas temperaturas que van de 13 ° C a 30 ° C (Saremi et al., 1999). Como colonizador raíz puede reducir o prevenir la asociación de un hongo micorrizico con la raíz. *F. equiseti* es especialmente común en las zonas más secas, por ejemplo, Bahrain (Mandeel, 1996) o Israel (Joffe et al., 1977), aunque también puede ser encontrado en suelos cerca del Círculo Polar Ártico (Kommedahl et al., 1988). Esta especie es un colonizador común de senescentes o tejido vegetal dañado. No es inusual aislar a *F. equiseti* de material de trigo

enfermo, sin embargo, los registros de *F. equiseti* como un patógeno deben ser tratados con precaución (Leslie y Summerell, 2006).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Sitio de muestreo

Durante el ciclo de cultivo Primavera-Verano 2013 (PV-2013), en las comunidades de Santiago Tillo, San Andrés Sinaxtla, Santo Domingo Yanhuitlán y San Bartolo Soyaltepec, ubicadas en la región montañosa de la subprovincia de la Mixteca Alta en los Valles Altos del estado de Oaxaca, utilizando un muestreo completamente al azar, se colectaron nueve muestras de 25 espigas cada una, con dos repeticiones, (450 espigas) de trigo de las variedades Altiplano F2007, Criollo Venturero, Nana F2007, Pavón y Rebeca F2000, del programa de trigo del Instituto Nacional de Investigación Forestal, Agrícola y Pecuaria (INIFAP), cultivadas bajo condiciones de temporal (Cuadro 1).

Cuadro 1. Sitios donde se llevó a cabo el muestreo

Muestra	Municipio	Localidad	Variedad
1	Santiago Tillo	Santiago Tillo	Criollo Venturero
2	San Andrés Sinaxtla	San Andrés Sinaxtla	Nana
3	San Andrés Sinaxtla	San Andrés Sinaxtla	Altiplano
4	Santiago Tillo	San Mateo Yucucui	Criollo Venturero
5	Santo Domingo Yanhuitlán	Yanhuitlán	Rebeca
6	Santo Domingo Yanhuitlán	Sitio Experimental Mixteca Oaxaqueña	Nana
7	San Bartolo Soyaltepec	San Pedro Añañe	Pavón
8	San Bartolo Soyaltepec	San Pedro Añañe	Rebeca
9	San Bartolo Soyaltepec	San Pedro Añañe	Rebeca

5.2. Municipios donde se realizó el muestreo

Durante el ciclo de cultivo Primavera-Verano 2013, el programa de trigo del INIFAP, estableció parcelas de cultivo de trigo bajo condiciones de temporal en la zona de Valles Altos de Oaxaca, cuyo manejo correspondió a las recomendaciones del mismo Instituto

para esa región del país (Villaseñor, 2013, comunicación personal). Sin embargo, debido a la presencia del huracán “Ingrid y la tormenta “Manuel”, las condiciones de humedad que prevalecieron en la zona, brindaron las condiciones óptimas para la aparición de la roña de la espiga del trigo, afectando seriamente la producción con pérdidas de hasta el 100%, por lo que se consideró el muestreo en cuatro municipios cuya ubicación y condiciones meteorológicas se describen a continuación.

5.2.1. Santiago Tillo

Se localiza al noroeste del Estado de Oaxaca a 2,080 metros sobre el nivel del mar, a 17° 27' latitud norte y 97° 19' longitud oeste. El clima que presenta de acuerdo a la clasificación de Copen es templado subhúmedo con lluvias en verano, con temperatura promedio anual de 16.4° C y precipitación pluvial de 847 mm promedio anual (Municipios de México, 2015).

5.2.2. San Andrés Sinaxtla

Se localiza al noroeste del estado de Oaxaca, a 2,100 metros sobre el nivel del mar, a 17°28' de latitud norte y 97°17' longitud oeste. El clima de este municipio es templado con las variaciones propias del tiempo (Municipios de México, 2015).

5.2.3. Santo Domingo Yanhuitlán

Se localiza en las coordenadas 17°31' de latitud norte y 97°20' de longitud oeste en la parte noroeste con relación a la capital del estado, a una altura de 2,140 msnm. El clima en este municipio es sub-húmedo con lluvias en verano (Municipios de México, 2015).

5.2.4. San Bartolo Soyaltepec

Se localiza en la parte noreste del estado, en las coordenadas 97°18' longitud oeste, 17°35' latitud norte y a una altura de 2,280 metros sobre el nivel del mar. Su clima es templado (Municipios de México, 2015).

5.3. Variedades Muestreadas

El programa de trigo de INIFAP ha liberado algunas variedades de trigo para siembra en temporales favorables e intermedios en México, entre las que se encuentran Altiplano

F2007, Nana F2007, Pavón y Rebeca F2000; además de éstas variedades mejoradas también se muestreo un trigo criollo conocido como "criollo venturero" el cual es un criollo que se ha venido sembrando en la región por mucho tiempo, cuyas características se describen a continuación.

5.3.1. Altiplano F2007

Es de hábito de primavera y fue obtenido en el Programa de Mejoramiento Genético de Trigo de Temporal del INIFAP por hibridación y selección en el año 2007. Su ciclo de cultivo promedio es de 116 días a madurez fisiológica (ciclo tardío), con una altura de planta de 94 cm (porte medio), de buena capacidad de amacollamiento, de tallos gruesos, y resistente al acame (INIFAP, 2011).

Después de seis años de evaluación en ambientes de temporal, Altiplano F2007 registró lecturas de 0R (resistencia R) a 20 MR (moderada resistencia MR) a Roya de hoja (*Puccinia triticina*). Y es resistente a moderadamente resistente (0R a 15MR) a las razas presentes de Roya amarilla (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) hasta P-V/2009 y moderadamente susceptible con lecturas de (40MS) a la raza 474MEX384 que se presentó en el ciclo O-I/09-10 en el Bajío (INIFAP, 2011).

5.3.2. Nana F2007

Es una variedad de trigo harinero de gluten fuerte, de ciclo precoz, de alto potencial, resistente a royas, tolerante a enfermedades foliares y con buena respuesta en cualquier condición de siembra bajo temporal. Esta variedad a pesar de ser de ciclo corto, expresa el alto potencial de rendimiento de los genotipos tardíos, por lo que incrementará los rendimientos en un 17% en promedio, con mayores ventajas que todas las variedades testigo en ambientes de sequía (hasta 22% en promedio), sin dejar de ser notable su mayor productividad también en ambientes lluviosos y medio lluviosos (Villaseñor, 2007).

5.3.3. 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 a 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; 2004).

5.4. DETERMINACIÓN DE INCIDENCIA Y SEVERIDAD DE ROÑA DE LA ESPIGA EN LAS MUESTRAS COLECTADAS.

La determinación de la incidencia de la roña del trigo se realizó mediante observación directa de cada una de las 450 espigas colectadas; se contabilizó el número de espigas con síntomas de la enfermedad por cada una de las muestras. La suma de las espigas infectadas con relación al total de espigas por muestra se expresó como porcentaje de incidencia por localidad (Figura 1(a)).

Para determinar la severidad de la enfermedad, a partir de la observación de cada espiga, considerada como unidad de observación, se contabilizó el número de espiguillas con síntomas de la roña. La totalidad de las espiguillas afectadas con relación al total de espiguillas por espiga, fueron expresados como porcentaje de severidad de la espiga. La suma del porcentaje de severidad de cada una de las 25 espigas que componen una muestra se ponderó para calcular la severidad de la roña de la espiga por localidad (Figura 1 (b)).



Figura 1. a) Espigas que comprendían una muestra; b) Espiga con daño.

5.4.1. Aislamiento de *Fusarium* spp.

De acuerdo con Mezzalama (2012), para la adecuada identificación de hongos del género *Fusarium* asociados a distintas enfermedades del trigo, a partir de granos o semillas, se recomienda utilizar la prueba de Papel secante y congelación.

5.4.1.1. Método de Papel Secante y Congelación (Freezing Blotter)

Para el aislamiento de hongos del género *Fusarium* a partir de grano, se utilizó la prueba de sanidad de papel secante y congelación descrita por Warham *et al.* (1998). Un total de 16 granos de trigo por muestra fueron desinfestados con hipoclorito de sodio (NaCl) al 3 % durante 3 minutos y enjuagados con tres cambios de agua destilada estéril durante 1 minuto; enseguida fueron colocados sobre papel filtro húmedo, dentro de cajas de plástico transparente y se sellaron para su incubación durante dos días a temperatura ambiente de 20 a 25 °C, con un fotoperíodo de 12 h con luz blanca proporcionada por lámpara de 32 Watts. Transcurrido el tiempo se sometieron a congelación a temperatura de -15 a -20 °C durante 24 h, y finalmente las cajas se mantuvieron bajo las condiciones iniciales de la prueba durante 11 d (Figura 2).

La prueba se evaluó a los 14 d después de su establecimiento. Para identificar desarrollo micelial y diferenciar el crecimiento de hongos del género *Fusarium* a partir del grano, cada grano se observó con microscopio estereoscópico (Olympus SZ51) y se hicieron preparaciones temporales que se observaron al microscopio compuesto (Olympus CX31) apoyándose para la identificación las características morfológicas descritas por Warham *et al.* (1998) y Barnett y Hunter (1988).

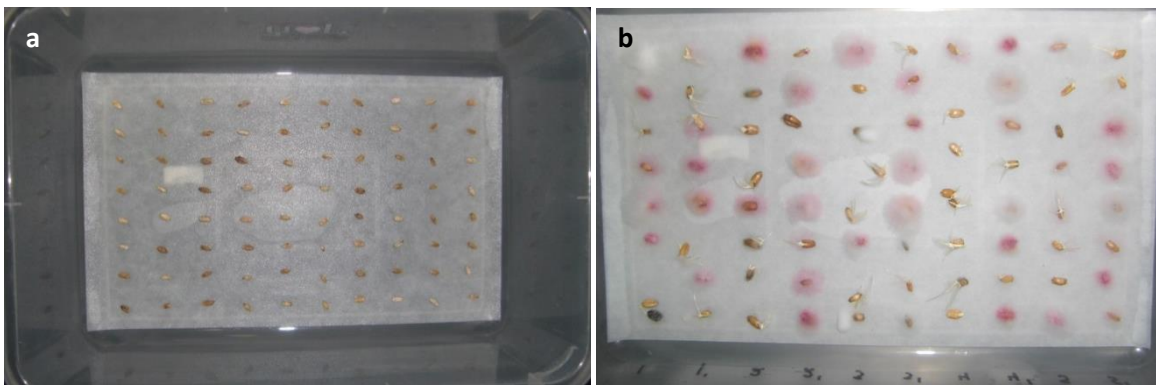


Figura 2. a) Granos de trigo en cajas transparentes; b) Esporulaci3n de los hongos en grano.

5.4.1.2. Aislamiento y purificaci3n

A partir de granos infectados, se hizo el aislamiento de hongos del genero *Fusarium* mediante la transferencia de micelio a cajas Petri con medio de cultivo Agar Agua (A-A). Las cajas se incubaron durante 8 d a 25 °C con luz blanca. De cada aislamiento, se obtuvieron cultivos monoconidiales.

Para la obtenci3n de cultivos monoconidiales de cada aislamiento, de acuerdo con lo descrito por Morales *et al.* (2007) y Moreno *et al.* (2005); en condiciones as3pticas, se prepar3 una suspensi3n de conidios en 10 mL de agua destilada est3ril; por separado, cada suspensi3n se deposit3 en una caja Petri con medio de cultivo A-A, despu3s de 10 s se decant3 y elimino el exceso de humedad sobre papel absorbente est3ril, las cajas se incubaron a temperatura ambiente por 24 h con luz blanca. Tres conidios germinados de cada aislamiento, se transfirieron de forma independiente a cajas Petri con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA), y otros tres conidios germinados se transfirieron a una caja con medio de cultivo A-A con trozos de hojas de clavel previamente esterilizados.

Los cultivos monoconidiales obtenidos se incubaron bajo condiciones de 22 a 25 °C con intervalos de cuatro d3as bajo oscuridad y posteriormente con luz blanca hasta obtener abundante esporulaci3n (Figura 3. a).

Se realiz3 la conservaci3n de los hongos en tubos de ensaye con medio de cultivo PDA y aceite mineral (Figura 3. b).

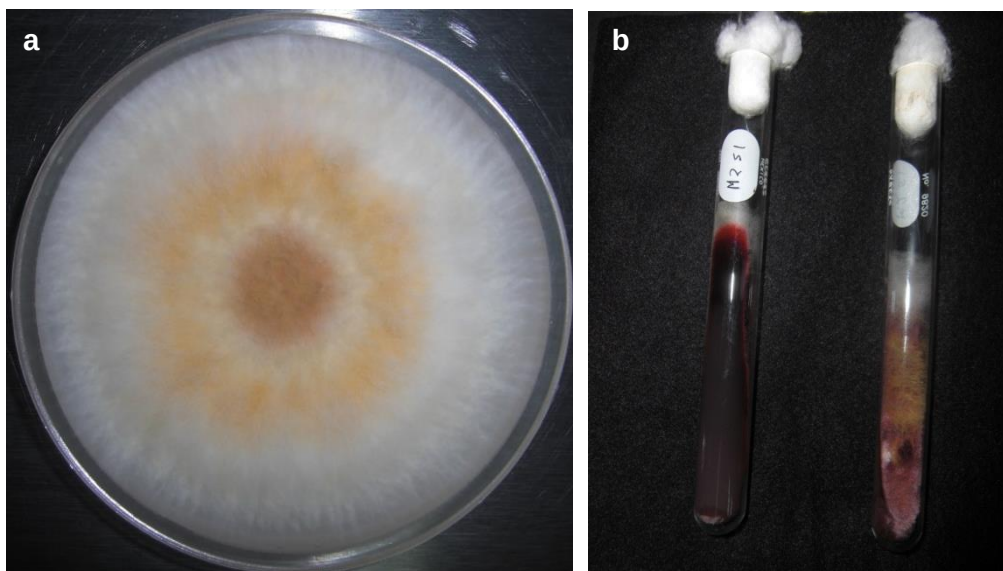


Figura 3. a) Aislamiento del hongo en nuevas cajas de PDA; b) Conservación del hongo en tubos con PDA y aceite.

5.5 Caracterización morfológica

La identificación morfológica de los hongos se realizó a partir de los aislamientos desarrollados en cajas de Petri sobre medio de cultivo PDA y AA con clavel, basado en las características descritas en las claves taxonómicas especializadas de Booth (1971), Nelson *et al.* (1983) y Leslie y Summerell (2006).

Las características morfológicas consideradas durante la identificación fueron: Velocidad de crecimiento, pigmentación y aspecto del micelio aéreo, nivel colonia de cultivo, así como presencia o ausencia, arreglo, tamaño, forma y coloración de micronocidios; tamaño, forma, coloración y número de células de macroconidios, y presencia o ausencia de clamidosporas.

5.6. Caracterización molecular

Doce cepas diferentes fueron consideradas para ser caracterizadas a través de técnicas moleculares.

5.6.1. Extracción de DNA

Para la extracción del DNA fúngico, se siguió el protocolo descrito por la empresa Macrogen para la utilización del Kit DNeasyPlant Mini Kit, Marca Quiagen.

De cada hongo purificado e incubado durante 15 días en medio de cultivo PDA y Agua-Agar, se transfirieron de 50 a 100 mg de micelio, a un tubo de microcentrifuga (Eppendorf), se adicionaron 400 µL de Buffer AP1 y 4 µL de RNasa, se agitó en vortex, se incubaron las muestras en baño maría por 10 min a 65 °C, agitando por inversión 2 ó 3 veces; se adicionaron 130 µL de Buffer AP2 y se mantuvieron 5 min en hielo. La mezcla se colocó en la columna QIAshredder Mini spin y se centrifugó por 2 min a 14,000 rpm. Se transfirió el líquido que pasó por la columna a un nuevo tubo de microcentrifuga, al que se le adicionaron 1.5 volúmenes del buffer AP3/E; se colocó en una columna DNeasy Mini spin, se centrifugó por 1 min a 8 000 rpm, se pasó a un nuevo tubo, se agregaron 500 µL del buffer AW; se centrifugó por 1 min a 8 000 rpm, se agregaron otros 500 µL del buffer AW y se centrifugó por 2 min a 14, 000 rpm, con el propósito de lavar el ADN; finalmente, se transfirió la columna DNeasy Mini spin a un tubo nuevo, se pusieron 100 µL de buffer AE del DNeasy para la elución, se incubó por 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó por 1 min a 8,000 rpm (Qiagen, 2012).

5.6.2. PCR y secuenciación

Una vez obtenido el ADN de las 12 cepas, el producto fue enviado a los Laboratorios de MACROGEN en Korea para la amplificación de dos regiones universales, una correspondiente a la región ITS, así como la región de los genes que codifican para el factor de elongación.

Para la amplificación de la región ITS se utilizaron los iniciadores universales ITS-4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS-5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') de genes rRNA, de las subunidades 18S, 5.8S y 28S. Los cuales amplifican un espaciador intergénico interno (ITS) y generan un producto de talla variable entre 550 y 585 pares de bases (pb) aproximadamente.

Por su parte los genes que codifican para el factor de elongación son EF1 ATGGGTAAGGAGGACAAGAC y EF2 GGAAGTACCAGTGATCATGTT, generan un producto de 700 pares de bases.

5.7. Diseño experimental

Se realizó un diseño experimental completamente al azar con dos repeticiones. Se corrió un Análisis de Varianza (ANOVA) al 95% y en los casos donde al menos uno de los tratamientos fue diferente se aplicó una prueba de Tukey con un 95% de confiabilidad.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Incidencia y severidad de roña de la espiga

Se observaron espigas con coloración pálida, de apariencia polvosa y compacta, con visible micelio de color rosa claro, ubicado principalmente en la base de las glumas.

La incidencia de la roña de la espiga del trigo reportó niveles elevados en todas las muestras, en ocho de ellas alcanzó el 100% y solo en una del 96% (Cuadro 2). En cuanto a la severidad, de las muestras evaluadas, la variedad Nana del Municipio de Santo Domingo Yanhuitlán en la localidad Sitio Experimental Mixteca Oaxaqueña presentó 100% de daño, el 66.6 % de las muestras se encontraron con valores de 60 a 86% de severidad, y el 22.2% de las muestras con severidad menor del 60% (Cuadro 2).

Cuadro 2. Incidencia y severidad de roña de la espiga, en las muestras.

Muestra	Municipio	Localidad	Variedad	Incidencia (%)*	Severidad (%)**
1	Santiago Tillo	Santiago Tillo	Criollo Venturero	100	51.64
2	San Andrés Sinaxtla	San Andrés Sinaxtla	Nana	96	80.36
3	San Andrés Sinaxtla	San Andrés Sinaxtla	Altiplano	100	85.61
4	Santiago Tillo	San Mateo Yucucui	Criollo Venturero	100	40.72
5	Santo Domingo Yanhuitlán	Yanhuitlán	Rebeca	100	67.8
6	Santo Domingo Yanhuitlán	Sitio Experimental Mixteca Oaxaqueña	Nana	100	100
7	San Bartolo Soyaltepec	San Pedro Añañe	Pavón	100	64.59
8	San Bartolo Soyaltepec	San Pedro Añañe	Rebeca	100	78.08
9	San Bartolo Soyaltepec	San Pedro Añañe	Rebeca	100	80.92

*% de espigas muestreadas con daño

**% de estratos o nudos afectados por espiga

6.1.1 Análisis estadístico, para incidencia y severidad en espiga

En el caso de la incidencia de la roña de la espiga se corrió un ANOVA al 95% y no se encontraron diferencias entre variedades. Se aplicó una prueba de Tukey con un 95% de confiabilidad, solo con el objetivo de realizar una agrupación demostrativa (Cuadro 3).

Cuadro 3. Análisis de incidencia de roña de la espiga por variedad; en espiga.

Agrupamiento Tukey	Medias	Variedad
A	100	Criollo venturero
A	100	Pavón
A	100	Altiplano
A	100	Rebeca
A	97.75	Nana

Mientras que en el caso de severidad, se corrió un ANOVA al 95% encontrándose diferencias estadísticas entre variedades y se aplicó una prueba de Tukey con un 95% de confiabilidad; la variedad Nana y la variedad Altiplano son las que resultaron con una mayor severidad con 89.84 y 85.30%, respectivamente. Por su parte la variedad Criollo Venturero presentó la menor severidad de la enfermedad con 45.84% (Cuadro 4). Al hacer el mismo análisis, considerando el municipio se encontró que Santiago Tillo fue el municipio con menor severidad (variedad Criollo Venturero), mientras que Santo Domingo Yanhuitlán, San Andrés Sinaxtla y San Bartolo Soyaltepec resultaron con una alta severidad de la enfermedad, sin diferencia estadísticamente significativa entre sí (Cuadro 5).

Cuadro 4. Análisis de severidad de roña de la espiga por variedad; en espiga.

Agrupamiento Tukey	Medias	Variedad
A	89.84	Nana
A	85.30	Altiplano
BA	75.30	Rebeca
B C	64.29	Pavón
C	45.84	Criollo venturero

Cuadro 5. Análisis de severidad de roña de la espiga por municipio; en espiga.

Agrupamiento Tukey	Medias	Municipio	Variedades.
A	83.45	Santo Domingo Yanhuitlán	Rebeca y Nana
A	82.74	San Andrés Sinaxtla	Nana y Altiplano
A	74.26	San Bartolo Soyaltepec	Pavón y Rebeca
B	45.84	Santiago Tillo	Criollo Venturero

6.2. Caracterización morfológica

A partir de muestras de espigas de trigo con síntomas de la enfermedad conocida como roña de la espiga del trigo, provenientes de las diferentes localidades de los Valles Altos de Oaxaca, se obtuvieron 64 aislamientos de hongos del género *Fusarium*, y se identificaron cinco especies cuyas características concuerdan por las descritas por Booth

(1971), Leslie y Summerell (2006), Nelson *et al.* (1983), Scaufaire *et al.* (2011), Warham (1998) y Zillinsky (1984), para *Fusarium graminearum*, *F. temperatum*, *F. verticilloides*, *F. equiseti* y *F. oxysporum*.

Los aislados cultivados en medio PDA desarrollaron una pigmentación y tipo de micelio aéreo que se describe en el Cuadro 6, concordante con lo descrito por Lester *et al.* (1988).

Cuadro 6. Características de las colonias de aislamientos de *Fusarium* spp. desarrolladas en medio de cultivo papa dextrosa agar.

Especie	Crecimiento	Pigmentación	Micelio
<i>F. graminearum</i>	Rápido	Rosado a purpura en ambos lados	Algodonoso
<i>F. verticilloides</i>	Rápido	Rosado a purpura en ambos lados	Algodonoso
<i>F. temperatum</i>	Rápido	Purpura oscuro en ambos lados	Algodonoso
<i>F. oxysporum</i>	Rápido	Purpura en el micelio y purpura oscuro en el agar.	Algodonoso
<i>F. equiseti</i>	Rápido	Café en ambos lados	Algodonoso

6.2.1. *Fusarium graminearum*

El crecimiento a partir de la semilla es con abundante micelio de aspecto algodinoso, con coloración inicialmente blanco que se torna de amarilla a rojo. Las colonias sobre medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) presentaron crecimientos rápidos, con micelio algodinoso de coloración rosado pálido en un inicio y tornándose purpura después de 12 días. Se observaron macroconidios hialinos, de rectos o ligeramente curvos, con tres a siete septas, de 25-50 por 2.5- 5 μ m. La célula basal se observó semejante a un pie bien desarrollado y una célula apical curva muy puntiaguda. Clamidosporas esféricas hialinas a color café pálido, de 10-12 μ (Figura 4).

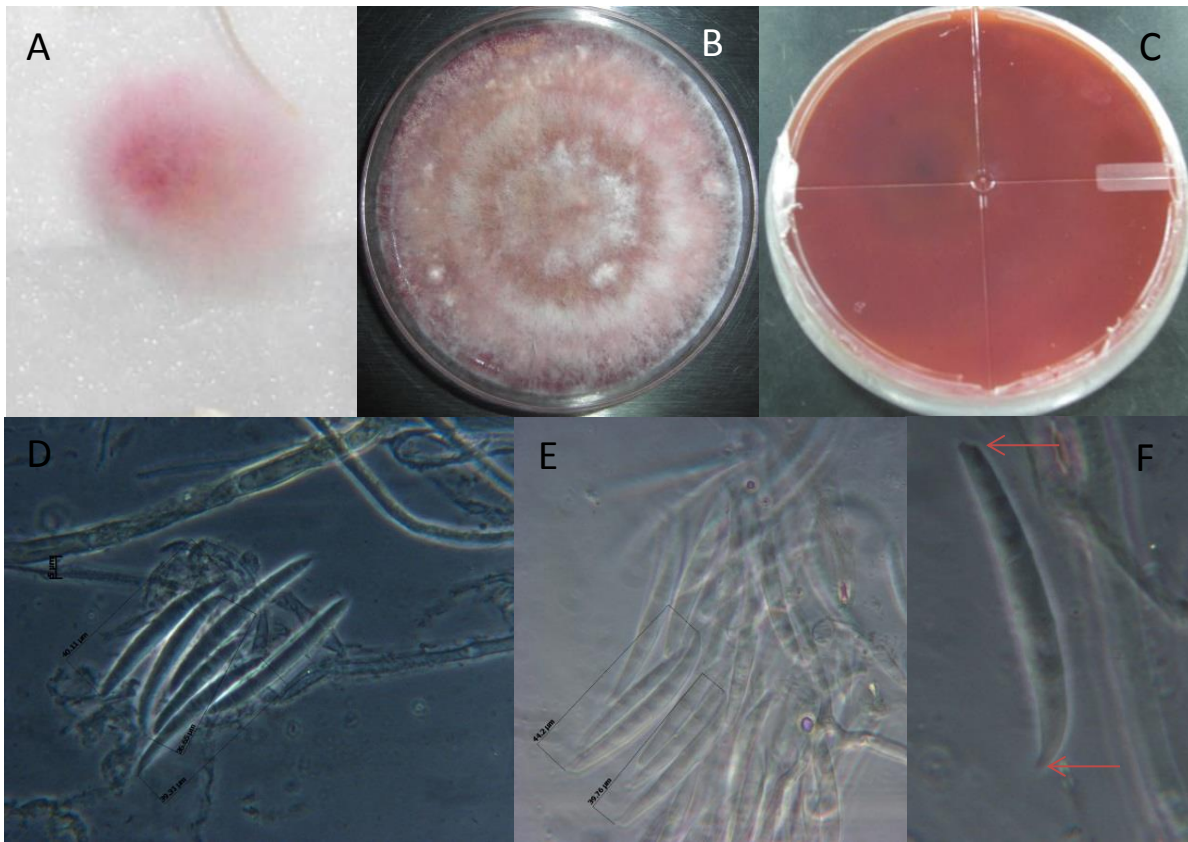


Figura 4. **Morfología de *Fusarium graminearum***. A) Colonia en granos de trigo; B y C) Crecimiento de la colonia en medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA); D, E y F) Macroconidios célula basal en forma de pie y célula apical curva muy puntiaguda (100X).

6.2.2. *Fusarium temperatum*

Los aislados presentaron micelio aéreo algodonoso con una coloración rosa, la pigmentación en el agar fue de un color violeta. Los macroconidios hialinos falcados de 3 a 6 septos. Microconidios de ovales a ovoides hialinos de 0 a 2 septas, en falsas cabezas (Fig. 5). Presentan monofialides y polifialides, clamidosporas ausentes.

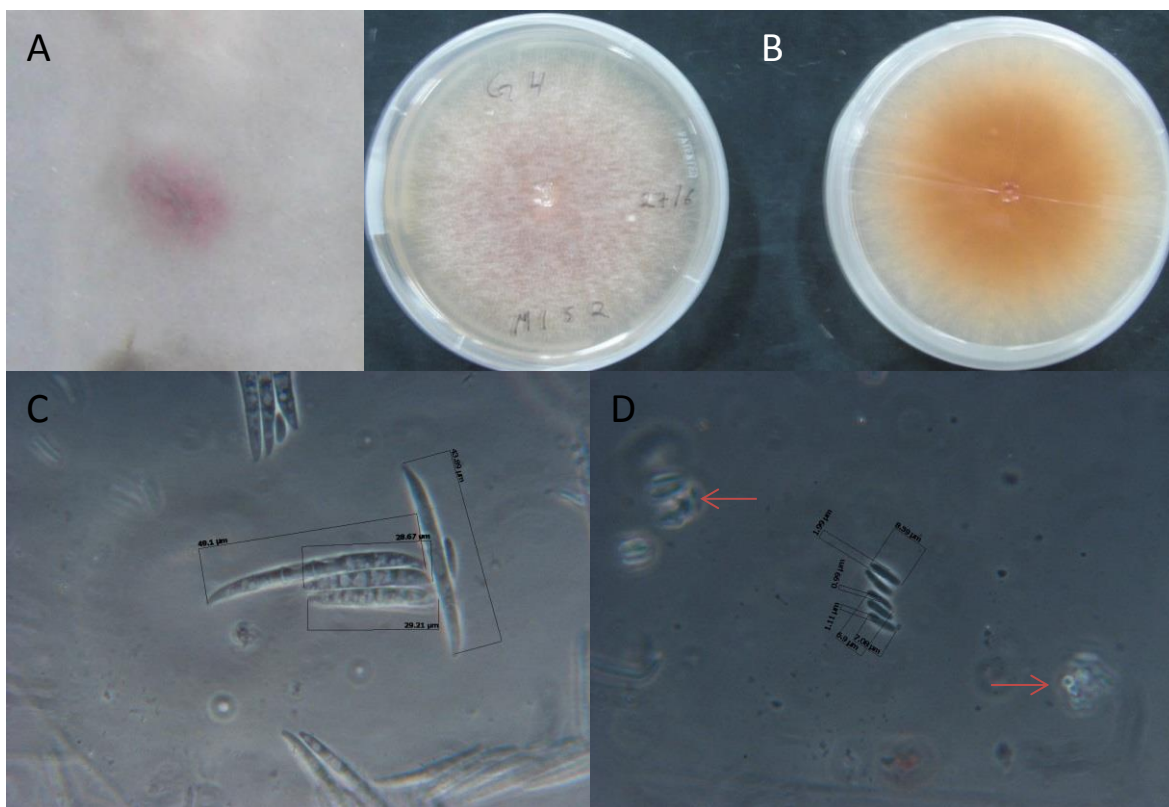


Figura 5. **Morfología de *Fusarium temperatum***. A) Crecimiento de la colonia en los granos de trigo; B) Crecimiento aéreo de la colonia en PDA, micelio aéreo algodónoso con una coloración rosa; superficie de la colonia en PDA, color violeta; C) Macroconidios hialinos falcados. D) Microconidios de ovales a ovoides en falsas cabezas (100X).

6.2.3. *Fusarium verticilloides*

La colonia en semilla se observó de color blanco, con micelio aéreo con apariencia pulverulento a causa de la formación de microconidios. La pigmentación en el medio PDA varió, desde un color blanquecino algodónoso a rosáceo violeta. Los microconidios hialinos, generalmente unicelulares, pero en ocasiones bicelulares; midieron de 5-12 x 1-3 µm, con forma oval o de garrote y ligeramente aplanados en cada extremo (Figura 6). Los macroconidios son hialinos, delicados, con paredes delgadas, y su forma varía de curvos a casi rectos; tienen 3-7 septas, miden 25-60 x 2-4 µm y la célula basal tiene forma de pie, aunque raramente se observa. Los microconidios son de forma oval no septados, es común encontrar largas cadenas formando una especie de orejas de ratón (Figura 6), se pueden observar monofialides (Leslie, 2006).

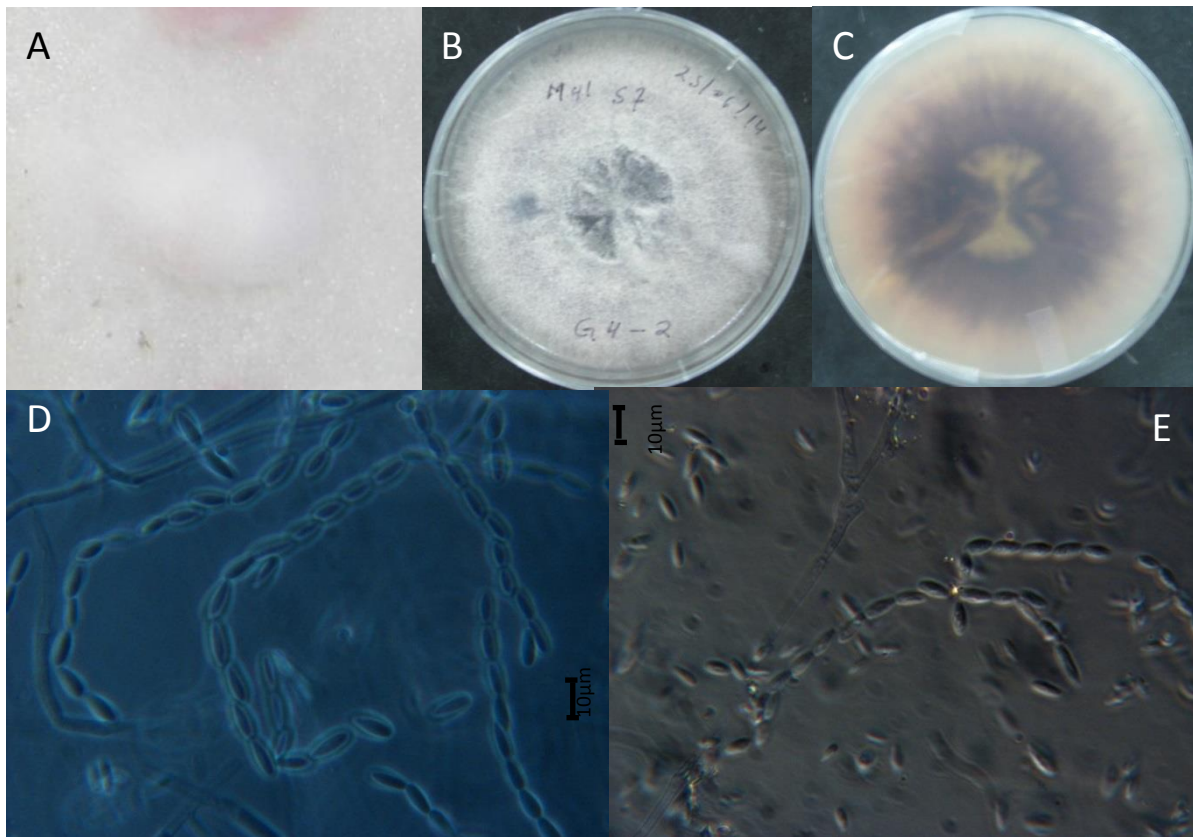


Figura 6. **Morfología de *Fusarium verticilloides***. A) Crecimiento de la colonia en los granos de trigo; B) Crecimiento aéreo de la colonia en PDA, micelio algodónoso blanquecino a rosáceo; C) Pigmentación en el medio PDA, color violeta; D y E) microconidios en largas cadenas (100X).

6.2.4. *Fusarium equiseti*.

La colonia en semilla fué inicialmente con micelio blanco pasando a un tinte durazno, que más tarde cambió a beige y finalmente a oliva oscuro o amarillo parduzco. Los aislados presentaron micelio que al principio fue blanco y con el tiempo se tornó de su color café en ambos lados. Los macroconidios se observaban muy largos con una célula basal en forma de látigo. El número de septos fué de 5 a 7, no presentó microconidios (Figura 7) y forma clamidosporas.

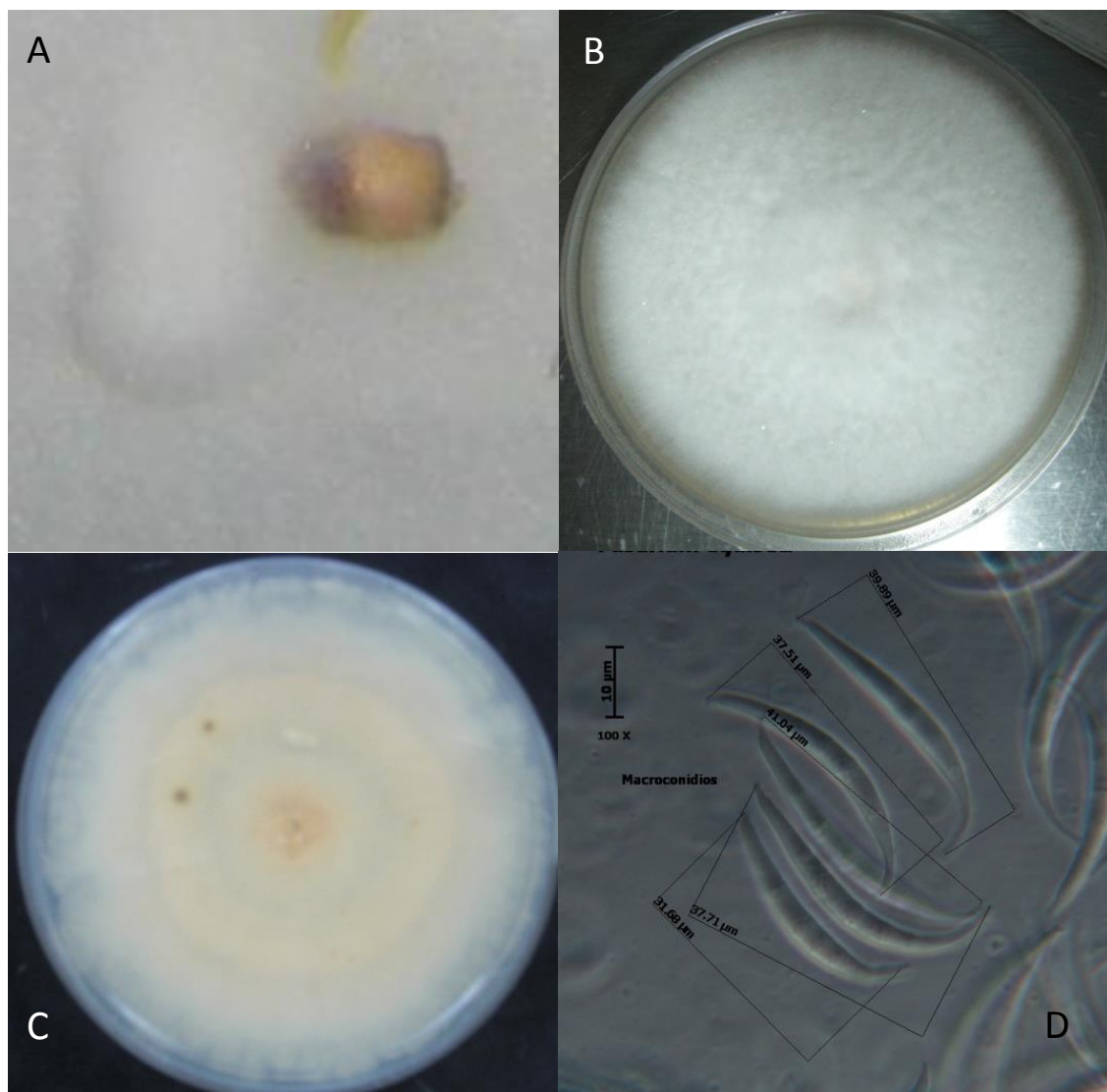


Figura 7. **Morfología de *Fusarium equiseti***. A) Crecimiento de la colonia en los granos de trigo; B) micelio, con coloración blanca; B) Pigmentación en el medio PDA, color blanca a café; D) Macroconidios muy largos con célula basal en forma de látigo (100X).

6.2.5. *Fusarium oxysporum*

La colonia en semilla creció con moderada rapidez y produjo micelio aéreo inicialmente blanco que cambió a color durazno, salmón, a purpura, violeta. Los aislados presentaron micelio algodonoso de escaso a abundante, con coloración de blanca a violeta, la pigmentación en el agar fue de un color purpura (Figura 8). Los macroconidios cortos, ligeramente curvos con la célula basal en forma de pie, usualmente con 3 septos.

Microconidios de ovales a elípticos sin septación, abundantes en micelio aéreo. Presenta monofialides cortas y una abundante formación de clamidosporas.

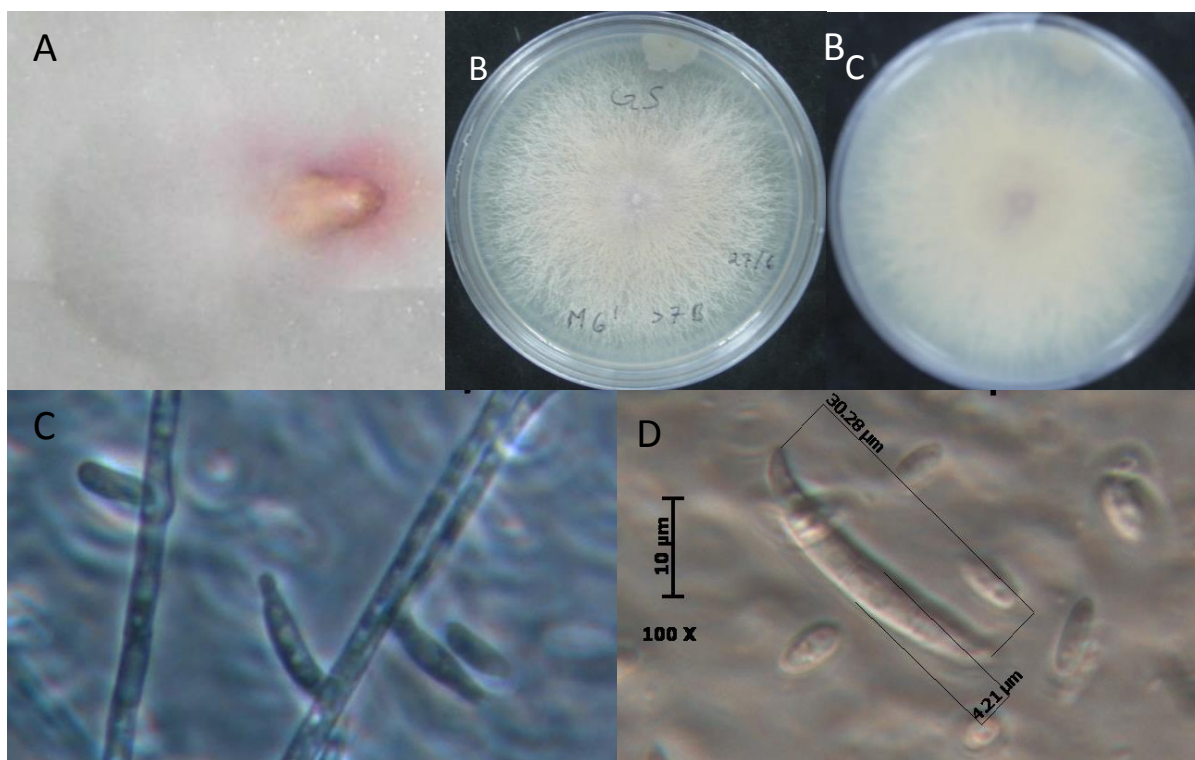


Figura 8. **Morfología de *Fusarium oxysporum***. A) Crecimiento de la colonia en los granos de trigo color blanco; B) Micelio algodonoso de escaso a abundante, con coloración de blanca a violeta, pigmentación en el agar color purpura; C) Monofialides cortas; D) Macroconidios con 3 septos y microconidios aceptados (100X).

6.2.6. Incidencia de *Fusarium* spp. en granos de trigo

En el ciclo P/V 2013 la incidencia de *Fusarium* sp. en granos de trigo reportó niveles muy elevados en todas las variedades muestreadas. La localidad de San Pedro Añãñe, alcanzó porcentajes de 100% en la variedad Rebeca y 93.75 % en la variedad Pavón. Mientras que en las localidades de Santiago Tillo (var. Crioyo Venturero), Yanhuitlán (var. Rebeca) y San Andrés Sinaxtla (var. Altiplano), presentaron los menores porcentajes de incidencia, con 75% en los tres casos (Cuadro 7).

Cuadro 7. Incidencia de *Fusarium* sp. en granos de trigo en las localidades de los Valles altos de Oaxaca en el ciclo de producción Primavera-Verano de 2013.

Muestra	Municipio	Localidad	Variedad	Incidencia *
1	Santiago Tillo	Santiago Tillo	Criollo Venturero	75
5	Santo Domingo Yanhuitlán	Yanhuitlán	Rebeca	75
3	San Andrés Sinaxtla	San Andrés Sinaxtla	Altiplano	75
4	Santiago Tillo	San Mateo Yucucui	Criollo Venturero	81.25
2	San Andrés Sinaxtla	San Andrés Sinaxtla	Nana	81.25
6	Santo Domingo Yanhuitlán	Sitio Experimental Mixteca Oaxaqueña	Nana	81.25
8	San Bartolo Soyaltepec	San Pedro Añañe	Rebeca	87.5
7	San Bartolo Soyaltepec	San Pedro Añañe	Pavón	93.75
9	San Bartolo Soyaltepec	San Pedro Añañe	Rebeca	100

*% de granos de trigo con presencia de *Fusarium* spp.

6.3. Análisis estadístico, para incidencia de *Fusarium* spp en granos de trigo.

En el caso de la incidencia de especies de *Fusarium* en grano, se corrió un ANOVA al 95% y se encontraron diferencia entre variedades, se aplicó una prueba de Tukey con un 95% de confiabilidad y los resultados fueron que en la var. Pavón fue en la que se presentó mayor incidencia de *Fusarium* spp y las de menor incidencia fueron la variedad Criollo Venturero y Altiplano Cuadro 8. Al hacer el mismo análisis, considerando el municipio se encontró que Santiago Tillo, San Andrés Sinaxtla y Santo Domingo Yanhuitlán fueron los municipios con menor incidencia, mientras que San Bartolo Soyaltepec fué el municipio con mayor incidencia en grano Cuadro 9.

Cuadro 8. Análisis de incidencia de *Fusarium* spp. por variedad; en granos.

Agrupamiento Tukey	Medias	Variedad
A	93.75	Pavón
B A	85.58	Rebeca
B A	81.25	Nana
B	75.00	Altiplano
B	75.00	Criollo venturero

Cuadro 9. Análisis de incidencia de *Fusarium* spp. por municipio; en granos.

Agrupamiento Tukey	Medias	Municipio	Variedad
A	91.66	San Bartolo Soyaltepec	Pavón y Rebeca
B	78.37	Santo Domingo Yanhuatlán	Rebeca y Nana
B	78.12	San Andrés Sinaxtla	Nana y Altiplano
B	75.00	Santiago Tillo	Criollo Venturero

Las especies de *Fusarium* que se presentaron en las cinco variedades fueron *Fusarium graminearum* y *F. equiseti*; mientras que *F. temperatum* y *F. verticilloides* se presenaron solo en cuatro variedades, Criollo Venturero, Nana, Altiplano y rebeca, no afectaron a la variedad Pavón; y *F. oxysporum* solo se encontró en la variedad. Nana y variedad Rebeca. Cuadro 10, 11, 12,13, 14 y 15.

Cuadro 10. Incidencia de *Fusarium graminearum*, *F. temperatum*, *F. verticilloides*, *F. equiseti* y *F. oxysporum* en granos de trigo en las 9 muestras de los Valles Altos de Oaxaca en el ciclo de producción Primavera-Verano de 2013.

Muestra	Variedad	Incidencia *	<i>F. graminearum</i> **	<i>F. temperatum</i> **	<i>F. verticilloides</i> **	<i>F. equiseti</i> **	<i>F. oxysporum</i> **
1	Criollo Venturero	75	37.5	31.25	0	6.25	0
5	Rebeca	75	25	18.75	31.25	0	0
3	Altiplano	75	31.25	25	12.5	6.25	0
4	Criollo Venturero	81.25	37.5	18.75	25	0	0
2	Nana	81.25	37.5	12.5	25	6.25	0
6	Nana	81.25	56.25	0	18.75	0	6.25
8	Rebeca	87.5	43.75	31.25	0	12.5	0
7	Pavón	93.75	81.25	0	0	12.5	0
9	Rebeca	100	43.75	25	6.25	18.75	6.25

*% de granos de trigo con presencia de *Fusarium* spp.

** % de incidencia por variedades

Cuadro 11. Análisis de la incidencia de *F. graminearum* en grano por variedades

Agrupamiento Tukey	Medias	Variedad
A	81.25	Pavón
BA	46.88	Nana
B	37.50	Criollo venturero
B	37.50	Rebeca
B	31.25	Altiplano

Cuadro 12. Análisis de la incidencia de *F. temperatum* en grano por variedades

Agrupamiento Tukey	Medias	Variedad
A	25	Criollo Venturero
A	25	Altiplano
A	25	Rebeca
A	6.25	Nana
A	0	Pavón

Cuadro 13. Análisis de la incidencia de *F. verticilloides* en grano por variedades

Agrupamiento Tukey	Medias	Variedad
A	21.88	Nana
A	12.50	Criollo Venturero
A	12.50	Altiplano
A	12.50	Rebeca
A	0	Pavón

Cuadro 14. Análisis de la incidencia de *F. equiseti* en grano por variedades

Agrupamiento Tukey	Medias	Variedad
A	12.50	Pavón
A	10.41	Rebeca
A	6.250	Altiplano
A	3.125	Nana
A	3.125	Criollo Venturero

Cuadro 15 Análisis de la incidencia de *F. oxysporum* en grano por variedades

Agrupamiento Tukey	Medias	Variedad
A	3.125	Nana
A	2.083	Rebeca
A	0	Altiplano
A	0	Pavón
A	0	Criollo Venturero

6.4. Identificación Molecular

Al utilizar los primers Universales para hongos de White *et al.* (1990), ITS4/ITS5, se obtuvieron fragmentos de 532 a 553 pb. Las secuencias obtenidas de estos fragmentos fueron comparadas con GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) del Instituto Nacional de Salud (NIH) de E.E.U.U. (Altschul *et al.*, 1997) obteniendo un 99% de similitud para el género *Fusarium* sp para la mayoría de las muestras. Dado que con estos iniciadores no se obtuvieron resultados para uno de los aislamientos (Cuadro 6), se obtuvo otra secuenciación utilizando los primers EF-1/EF-2.

Los fragmentos obtenidos al utilizar los primers EF-1/EF-2, que de acuerdo con O'Donnell *et al.* (1998), amplifican el gen que codifica para una proteína del factor de elongación, fueron de 699 a 708 pb, permitiendo obtener similitudes del 99% para todas las secuencias obtenidas cuando fueron comparadas con el GenBank.

Como resultado de la comparación de las secuencias obtenidas de los aislamientos bajo estudio, con la base de datos del GenBank, se corroboró que las especies de *Fusarium* asociadas a la roña del trigo en Valles Altos de Oaxaca son *F. graminearum*, *F. verticillioides*, *F. temperatum*, *F. equiseti* y *F. oxysporum* (Cuadro 16), que corresponden a las especies identificadas de acuerdo a sus características morfológicas.

Cuadro 16. Resultados de la caracterización molecular de *Fusarium* spp. con los primers ITS4/ITS5 y EF-1/EF-2

Hongo	% de identidad con ITS4/ITS5	% de identidad con EF-1/EF-2
<i>F. graminearum</i>	99	99
<i>F. verticillioides</i>	98	99
<i>F. temperatum</i>	-	99
<i>F. equiseti</i>	99	99
<i>F. oxysporum</i>	99	99

6.5. Discusión

Los altos niveles de incidencia y severidad de la enfermedad encontrados (mayores al 40%) pueden explicarse si se considera que los materiales en campo estuvieron expuestos a condiciones de elevada humedad relativa, como resultado de los fenómenos climatológicos del huracán “Ingrid y la tormenta “Manuel”, condición que de acuerdo con Fores et al. (2007) e Ireta y Gulchrist (1994), favorecen la aparición y desarrollo de la roña de la espiga del trigo.

Con relación a las especies del género *Fusarium* aisladas a partir de granos con síntomas de roña del trigo, los resultados concuerdan con lo reportado por Moedano (2013), quien reportó el aislamiento de *Fusarium avenaceum*, *F. graminearum*, *F. verticilloides*, *F. nivale* y *F. solani*, como especies relacionadas a la enfermedad roña de la espiga, a partir de las variedades Rebeca F2000 y Tlaxcala F2000, en las localidades de Santa Lucia, Chapingo, Coatepec, Juchitepec, Francisco I. Madero, Nanacamilpa, Francisco Villa, Terrenate, Texcal, Tenango del aire y Jilotepec, Estado de México, durante los ciclos P/V 2010 y 2011. De la misma forma, concuerda con lo reportado por Gutierrez (2014) quien señala a *Fusarium verticillodes*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium avenacearum* y *Helminthosporium sativum* asociados a semilla de trigo en Apizaco, Tlaxcala.

Los resultados del presente trabajo también concuerdan con Gilchrist-Saavedra et al., 2005, quien encontró que en México, la especie que predomina como causal de la roña de la espiga de trigo es *Fusarium graminearum*, pero también están presentes *F. culmorum*, *F. nivale*, *F. equiseti*, *F. avenaceum*, *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. decemnullare*, *F. solani* y *F. oxysporum*.

La importancia de las especies aisladas e identificadas radica en que *Fusarium graminearum* ha sido reportada como agente causal de la enfermedad de la roña del trigo, además de que *F. graminearum*, *F. verticilloides* son consideradas productoras de micotoxinas de importancia para la salud humana y animal y pueden ser transmitidas por semilla y sobrevivir en residuos de cosecha, constituyendo una fuente importante de inóculo de la enfermedad (Flores et al., 2007, Lozano et al., 2011, Orantes et al., 2011, Ribichich y Vegetti, 2000/2001).

7.- CONCLUSIONES

Dados que todas las variedades de trigo sembradas en Valles Altos de Oaxaca presentaron altos niveles de incidencia y severidad de roña del trigo, así como incidencias elevadas de *Fusarium* spp. en los granos de trigo, se considera que las condiciones de humedad y precipitación en los Valles Altos de Oaxaca, fueron determinantes en el desarrollo de hongos del género *Fusarium* y de la enfermedad.

Los hongos patógenos identificados en los granos de trigo (*Triticum aestivum* L.) en los diferentes municipios (Santiago Tillo, Santo Domingo Yanhuitlán, San Andrés Sinaxtla y San Bartolo Soyaltepec) en las variedades (Altiplano F2007, Criollo Venturero, Nana F2007, Pavón y Rebeca F2000) durante el ciclo P/V 2013, fueron: *Fusarium graminearum*, *F. temperatum*, *F. verticilloides*, *F. equiseti* y *F. oxysporum*.

La especie dominante es *F. graminearum*, se presentó en todas las localidades y en el 52.5% de los granos infectados por *Fusarium* spp, seguido de *F. temperatum* con el 21.6% y *F. verticilloides* 15.8%.

La técnica de PCR confirmó la correcta identificación de las especies de *Fusarium* que se reportaron como asociados a la sintomatología de la roña del trigo, en trigo de temporal en Valles Altos de Oaxaca.

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 y de *Fusarium* sp.

8. BIBLIOGRAFÍA

- ✓ 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 organisms by polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 15s rRNA gene. *Phytopathology* 82:828-832.
- ✓ 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.
- ✓ Desjardins, A. E., 2006. *Fusarium* mycotoxins. Chemistry, Genetics, and Biology. The American Phytopathological Society. APS Press, St. Paul, Minnesota U.S.A.
- ✓ Flores L.H.E., Ireta M.J. y Ruíz C.J.A., 2007. Factores meteorológicos asociados al Tizon de la Espiga (*Fusarium graminearum* Schwabe) en trigo (*Triticum aestivum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología*. 25(2):102-108
- ✓ 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.
- ✓ Gutierrez, T. E. A. 2014 Efecto de diferentes fuentes de N en la incidencia de hongos fitopatógenos en grano de trigo (*Triticum aestivum* L.) bajo siembra en camas permanentes en Valles Altos de México. *Parasitología Agrícola*. UACH
- ✓ Ireta M., J. y L. Gilchrist. 1994. Roña o tizón de la espiga del trigo (*Fusarium graminearum* Sch.).
- ✓ 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).

- ✓ Leslie-F. Jonh., Summerell-A. Brett. 2006. The Fusarium Laboratory Manual. Blackwell Publishing 369 pp
- ✓ Leslie, J. F., K. A. Zeller, M. Wohler, and B. A. Summerell. 2004. Interfertility of two mating populations in the *Gibberella fujikuroi* species complex. European Journal of Plant Pathology 110: 610-618.
- ✓ Lester, W. B, Craig, M. L., Brett, A. S. 1988. Laboratory Manual for Fusarium Research. The University of Sydney 156 pp.
- ✓ Liddell, C. M., and L. W. Burgess. 1985. Survival of *Fusarium moniliforme* at controlled temperature and relative humidity. Transactions of the British Mycological Society 84:121-130.
- ✓ Lozano R. N., Mezzalama M- Carballo C. A. y Hernández L. A. 2011. Efectos de Fungicidas en la calidad fisiológica de la Semilla de Trigo harinero (*Triticum aestivum* L.) y su eficacia en el control de *Fusarium graminearum* Schwabe (*Gibberella zeae* (Scwein) Petch) y *Bipolaris sorokiniana* (Sacc) Shoemaker (*Cochiobolus* S. Ito y Kurib). Revista Mexicana de Fitopatología 24(2): 115-121.
- ✓ Moedano, M. M. 2013. Incidencia de *Fusarium* spp. En trigo (*Triticum aestivum* L.) procedente de los Valles Altos de México. Parasitología Agrícola. UACH. 57 p.
- ✓ Morales, R. I.; Yañez, M. M.J.; Silva, R. H. V.; García, S.G.; Guzmán, P. D. A. 2007. Biodiversity of *Fusarium* species in Mexico associated with ear rot in maize, and their identification using a pylogenetic approach. Mycopathologia 163:31-39.
- ✓ Municipios de México, Revisado en línea 2015. <http://www.municipiosdemexico.gob.mx/>
- ✓ 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., Gosman, N., Draeger, R. Thomsett, M., Chandler, E. and Steed, A. 2007. The *Fusarium* head blight pathosystem: Status and

knowledge of its components. In: *Weat Production in Stressed Environments*. The Netherlands 794 p.

- ✓ Orantes G. C., Garrido R. E.R., Espinosa P. N. y Quiroga M. R., 2011. Resistencia de varios genotipos de trigo (*Triticum aestivum* L.) a *Fusarium graminearum* Schwabe cultivados en Chiapas, México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 14(1): 209-220.
- ✓ Ramírez, M. C. 2003. La fusariosis de la espiga de la cebada: especies, distribución, daños toxinas y perspectivas de manejo en los Valles Altos de México, *Parasitología Agrícola*. UACH. pp 17.
- ✓ Ribichich K.F. y Vegetti A.C., 2000/2001 Fusariosis de la espiga del trigo: evaluación de caracteres exomorfológicos asociados a la resistencia. *Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata*. 1042):121-127.
- ✓ Scauflaire, J., Gourgue, M., Munaut, F. 2011. *Fusarium temperatum* sp. nov. from maize, an emergent species closely related to *Fusarium subglutinans*. *Mycologia*, 103(3), pp. 586–597.
- ✓ Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Revisado en línea: <http://www.siap.gob.mx/>
- ✓ Villaseñor, M. H. E. 2000. Importancia del trigo. *In*: Villaseñor, M. H. E., y R. E. Espitia (eds). *El Trigo de Temporal en México*. Chapingo, Estado de México, México, SAGAR, INIFAP, CIRCE, CEVAMEX. Libro Técnico Núm. 1. pp: 7-22.
- ✓ 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., Espitia R. E., Huerta E. J., González I. R., Solís M. E. y Peña B. J., 2004. Rebeca 2000, nueva variedad de trigo para siembras en temporales favorables e intermedios en México. *Revista Fitotécnica Mexicana* 27 (3): 285-287.
- ✓ Villaseñor M., H. E. 2007. Nana F2007: Nueva variedad de trigo harinero para siembras de temporal en México. Chapingo, Estado de Méx., México. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Instituto Nacional

de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Valle de México. (Folleto Técnico, en prensa).

- ✓ 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.
- ✓ 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.
- ✓ 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.