



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO**  
**DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA**

DIFERENCIACIÓN DE FORMAS ESPECIALES DE *Fusarium oxysporum* CON  
MARCADORES GENÉTICO-MOLECULARES Y PRUEBAS DE PATOGENICIDAD

**TESIS**

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL**

**PRESENTA:**

**ABIMAE LÓPEZ LÓPEZ**



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



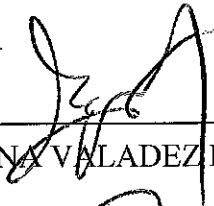
CHAPINGO, EDO. DE MÉXICO, JULIO DE 2007

DIFERENCIACIÓN DE FORMAS ESPECIALES DE *Fusarium*  
*oxysporum* CON MARCADORES GENÉTICO-MOLECULARES Y  
PRUEBAS DE PATOGENICIDAD

Tesis realizada por ABIMAE LÓPEZ LÓPEZ 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:



---

DRA. ERNESTINA VALADEZ MOCTEZUMA

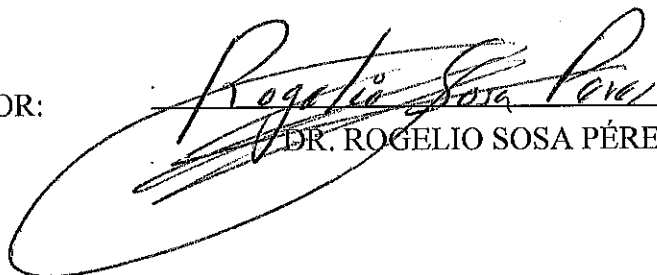
ASESOR:



---

DR. MARCELO ACOSTA RAMOS

ASESOR:



---

DR. ROGELIO SOSA PÉREZ

## AGRADECIMIENTOS

*Al Consejo Nacional de la Ciencia y Tecnología (CONACYT) por financiar mis estudios de Maestría en Ciencias*

*A la Universidad Autónoma Chapingo, especialmente a los profesores del Postgrado en Protección Vegetal por compartir sus conocimientos, tiempo y experiencia en mi formación*

*A la Dra. Ernestina Valadez Moctezuma por su invaluable ayuda, paciencia y tiempo dedicado en la dirección de este trabajo. Gracias por ayudarme en los momentos más difíciles durante el desarrollo de ésta investigación.*

*Al Dr. M. Baum de ICARDA, Siria. Que desinteresadamente donó semillas de líneas diferenciales para la realización de la presente investigación.*

*Al Dr. Fred J. Muehlbauer de Washington State University, USA, por donar muestras de DNA de las razas 1, 2, 3, 4 y 5 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, los cuales fueron empleados para el desarrollo de esta investigación*

*Al Dr. Rogelio Sosa Pérez del Centro de Ciencias de Sinaloa por financiar mi estancia como parte del desarrollo de esta investigación*

*Al Ph D. Nahum Marbán Mendoza por sus sugerencias y dedicación al presente trabajo*

*Al Dr. Marcelo Acosta Ramos por su vista crítica y objetiva en la revisión del este trabajo.*

*Al Dr. Víctor Manuel Pinto por su ayuda incondicional con equipo y material para la realización de este trabajo*

*A la M. C. Lily X. Zelaya por sus valiosas sugerencias durante el desarrollo de ésta investigación*

*Al M. C. Carlos Núñez por hacer un espacio de su tiempo y ayudarme el análisis multivariado de datos.*

*A Abigail Vargas por su invaluable amistad...gracias por decirme palabras que me levantaron el ánimo.*

*A mis compañeros y amigos del laboratorio que en momentos de requerir una mano más, ahí estuvieron*

## DEDICATORIA

*A mis padres: Celia y Atristáin que jamás me negaron la oportunidad de hacer lo que he deseado.*

*A mis hermanos: Jorge, Javier, Elvia e Irma, a quienes siempre he extrañado en mi vida de estudiante.*

*A mis primas y primos quienes siempre buscaron ocasión para olvidarme del laboratorio unos instantes.*

*Al profesor Maurino Martínez García, por mostrarme una forma de alcanzar el éxito (la preparación).*

## *DATOS BIOGRÁFICOS*

*Abimael López López nació el 20 de enero de 1975 en la comunidad de El Oro, Nuxaá, Nochixtlán Oaxaca.*

*Sus estudios de nivel medio superior y superior lo realizó en la Universidad Autónoma Chapingo, donde se graduó como Ingeniero Agrónomo Especialista en Parasitología agrícola en 1999.*

*Se desempeñó como auxiliar en inspección fitozoosanitaria en el puerto de Manzanillo, Colima, donde coordinó y supervisó el tratamiento de productos procedentes de países cuarentenados por riesgo de introducción de plagas exóticas.*

*De agosto de 2004 a agosto de 2006, cursó la Maestría en Protección Vegetal del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo*

## ÍNDICE GENERAL

|                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------|----|
| ÍNDICE GENERAL                                                                  | i  |
| ÍNDICE DE CUADROS                                                               | v  |
| ÍNDICE DE FIGURAS                                                               | ix |
| RESUMEN GENERAL                                                                 | x  |
| ABSTRACT                                                                        | x  |
| I. INTRODUCCIÓN                                                                 | 1  |
| 1.1. HIPÓTESIS                                                                  | 3  |
| 1.2. OBJETIVO GENERAL                                                           | 3  |
| 1.2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS                                                    | 3  |
| II. REVISION DE LITERATURA                                                      | 4  |
| 2.1. El cultivo del garbanzo                                                    | 4  |
| 2.1.1. Antecedentes                                                             | 4  |
| 2.1.2. Origen y distribución del garbanzo                                       | 5  |
| 2.1.3. Importancia económica mundial del garbanzo                               | 5  |
| 2.1.4. Estacionalidad de la oferta en el mundo                                  | 7  |
| 2.1.5. Exportadores de garbanzo                                                 | 8  |
| 2.1.6. Importancia del garbanzo en México                                       | 9  |
| 2.1.7. La evolución del garbanzo en México                                      | 10 |
| 2.1.8. Características botánicas del cultivo                                    | 17 |
| 2.2. Problemas fitosanitarios del garbanzo                                      | 19 |
| 2.3. <i>Fusarium oxysporum</i> Schl. f. sp. <i>ciceris</i> (Padw.) Matuo & Sato | 19 |
| 2.3.1. Antecedentes                                                             | 19 |
| 2.3.2. Distribución                                                             | 20 |
| 2.3.3. Epidemiología                                                            | 20 |
| 2.3.4. Clasificación taxonómica                                                 | 22 |

|         |                                                                                                                                                                                 |    |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.3.5   | Descripción del patógeno.                                                                                                                                                       | 22 |
| 2.3.6   | Sintomatología                                                                                                                                                                  | 23 |
| 2.3.7   | Especialización fisiológica de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp <i>ciceri</i>                                                                                                     | 25 |
| 2.3.8   | Identificación de razas de <i>F oxysporum</i> . f. sp. <i>ciceris</i> mediante pruebas de patogenicidad                                                                         | 28 |
| 2.3.9   | Control de la fusariosis vascular del garbanzo mediante cultivares resistentes                                                                                                  | 30 |
| 2.4     | Herramientas disponibles en la identificación y diagnóstico de hongos fitopatógenos                                                                                             | 32 |
| 2.4.1   | Marcadores                                                                                                                                                                      | 33 |
| 2.4.2   | Marcadores morfológicos                                                                                                                                                         | 33 |
| 2.4.3   | Marcadores genéticos                                                                                                                                                            | 34 |
| 2.4.4   | Comparación de secuencias de genes altamente conservados                                                                                                                        | 35 |
| III     | MATERIALES Y MÉTODOS                                                                                                                                                            | 36 |
| 3.1     | Fase de laboratorio                                                                                                                                                             | 36 |
| 3.1.1   | Colecta de plantas de garbanzo enfermas en Sinaloa                                                                                                                              | 36 |
| 3.1.2   | Aislamiento de <i>Fusarium oxysporum</i> de plantas de garbanzo                                                                                                                 | 37 |
| 3.1.3   | Obtención de cultivos monoconidiales                                                                                                                                            | 38 |
| 3.1.4   | Aislamientos procedentes de Guanajuato y Michoacán                                                                                                                              | 39 |
| 3.1.5   | Extracción de DNA geonómico                                                                                                                                                     | 42 |
| 3.1.6   | Cuantificación de DNA                                                                                                                                                           | 43 |
| 3.1.7   | Calidad del DNA                                                                                                                                                                 | 43 |
| 3.1.8.  | Identificación y diferenciación de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> de aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> procedentes de Sinaloa, Michoacán y Guanajuato. | 44 |
| 3.1.8.1 | Reacciones de amplificación con PCR                                                                                                                                             | 44 |
| 3.1.8.2 | Electroforesis de la amplificación.                                                                                                                                             | 45 |
| 3.1.9   | Comparación de aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> de México respecto a controles positivos de razas de este patógeno procedente de USA.            | 46 |
| 3.1.9.1 | Selección de iniciadores ISSR                                                                                                                                                   | 46 |
| 3.1.9.2 | Geles de Acrilamida al 8%                                                                                                                                                       | 48 |

|          |                                                                                                                                                                                |    |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1.9.3  | Tinción y lavado del gel                                                                                                                                                       | 48 |
| 3.1.9.4  | Fotodocumentación de geles                                                                                                                                                     | 49 |
| 3.1.10   | Comparación de perfiles de bandas de DNA generadas con AFLP<br>(Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados)                                                    | 49 |
| 3.1.10.1 | Digestión del DNA de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i>                                                                                                           | 50 |
| 3.1.10.2 | Ligación de adaptadores                                                                                                                                                        | 50 |
| 3.1.10.3 | Reacción de preampliación                                                                                                                                                      | 51 |
| 3.1.10.4 | Reacción de amplificación selectiva                                                                                                                                            | 52 |
| 3.1.10.5 | Electroforesis de los productos de AFLPs                                                                                                                                       | 54 |
| 3.1.10.6 | Tinción y lavado del gel                                                                                                                                                       | 56 |
| 3.1.10.7 | Revelado del gel                                                                                                                                                               | 56 |
| 3.1.10.8 | Fotodocumentación de los geles de AFLP                                                                                                                                         | 57 |
| 3.1.11.  | Comparación de secuencias del factor de elongación y de la<br>traducción 1 $\alpha$ ( <i>EF1<math>\alpha</math></i> ) de aislamientos procedentes de Guanajuato y<br>Michoacán | 57 |
| 3.1.11.1 | Amplificación del gen de factor de elongación y de la traducción 1 $\alpha$<br>( <i>EF1<math>\alpha</math></i> )                                                               | 58 |
| 3.2      | Fase de invernadero                                                                                                                                                            | 60 |
| 3.2.1    | Plantas diferenciales y aislamientos evaluados                                                                                                                                 | 60 |
| 3.2.2    | Germinación de semillas                                                                                                                                                        | 61 |
| 3.2.3    | Incremento del inoculo                                                                                                                                                         | 62 |
| 3.2.4    | Inoculación                                                                                                                                                                    | 62 |
| 3.2.5    | Evaluación de la respuesta de las variedades diferenciales de<br>garbanzo a las inoculaciones de <i>Fusarium oxysporum</i>                                                     | 62 |
| IV       | RESULTADOS Y DISCUSION                                                                                                                                                         | 63 |
| 4.1      | Aislamiento e identificación de <i>Fusarium oxysporum</i> de muestras<br>del estado de Sinaloa                                                                                 | 63 |
| 4.2      | Extracción, cuantificación y calidad del DNA de <i>Fusarium<br/>oxysporum</i> .                                                                                                | 64 |
| 4.3      | Identificación y diferenciación de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i><br>de aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> procedentes de Sinaloa,                     | 64 |

|       |                                                                                                                                                                                 |    |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
|       | Michoacán y Guanajuato                                                                                                                                                          |    |
| 4.4   | Comparación de aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> de México respecto a controles positivos de razas de este patógeno procedente de USA.            | 66 |
| 4.4.1 | Comparación de perfiles ISSR                                                                                                                                                    | 67 |
| 4.4.2 | Comparación de perfiles AFLPs.                                                                                                                                                  | 69 |
| 4.4.3 | Análisis estadístico de marcadores ISSR y AFLP.                                                                                                                                 | 70 |
| 4.4.4 | Interpretación del dendrograma generado con marcadores ISSR.                                                                                                                    | 70 |
| 4.4.5 | Interpretación del dendrograma generado de los datos de AFLP.                                                                                                                   | 72 |
| 4.5   | Comparación de secuencias del gene de factor de elongación y de la traducción $1\alpha$ ( <i>EF1<math>\alpha</math></i> ) de aislamientos procedentes de Guanajuato y Michoacán | 74 |
| 4.6   | Evaluación de la respuesta de las variedades Blanco Sinaloa 92 y JG-62 a las inoculaciones varias formas especiales de <i>Fusarium oxysporum</i> en invernadero                 | 76 |
| 4.7   | Evaluación de la respuesta de las variedades diferenciadoras de garbanzo a las inoculaciones <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> .                                  | 77 |
| V     | CONCLUSIONES                                                                                                                                                                    | 80 |
| VI    | BIBLIOGRAFIA                                                                                                                                                                    | 82 |

## INDICE DE CUADROS

|            |                                                                                                                                    | Página |
|------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Cuadro. 1  | Rendimiento en kg por hectárea del 2001 al 2005 para aquellos países que años anteriores presentaron altos índices de rendimiento. | 7      |
| Cuadro. 2  | Volumen de exportación de garbanzo en miles de toneladas por lo principales países exportadores durante el 2001 al 2005            | 9      |
| Cuadro.3   | Producción de garbanzo grano blanco por entidad federativa de temporal y riego en el 2004                                          | 12     |
| Cuadro. 4  | Resumen nacional de producción de garbanzo grano blanco en la Republica Mexicana del 2001 al 2005                                  | 12     |
| Cuadro. 5  | Producción de garbanzo grano por entidad federativa de riego y temporal en el 2003                                                 | 13     |
| Cuadro. 6  | Producción de garbanzo grano por entidad federativa de riego y temporal en el 2001                                                 | 13     |
| Cuadro. 7  | Resumen nacional de la producción de garbanzo grano de riego y temporal del 2001 al 2005                                           | 13     |
| Cuadro. 8  | Producción de garbanzo forrajero por entidad federativa de riego y temporal del 2001                                               | 14     |
| Cuadro. 9  | Producción de garbanzo forrajero por entidad federativa grano en la modalidad de riego y temporal del 2002                         | 14     |
| Cuadro. 10 | Producción de garbanzo forrajero por entidad federativa grano en la modalidad de riego y temporal del 2003                         | 15     |
| Cuadro. 11 | Producción de garbanzo forrajero por entidad federativa en la modalidad de riego y temporal del 2004                               | 15     |
| Cuadro. 12 | Producción de garbanzo forrajero por entidad federativa en la modalidad de riego y temporal del 2005                               | 16     |

|            |                                                                                                                                                                          |    |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Cuadro. 13 | Resumen nacional de la producción garbanzo forrajero de riego y temporal del 2001 al 2005.                                                                               | 16 |
| Cuadro. 14 | Producción de garbanzo porquero por entidad federativa de riego y temporal en el 2004                                                                                    | 16 |
| Cuadro. 15 | Producción de garbanzo porquero por entidad federativa de riego y temporal en el 2005                                                                                    | 17 |
| Cuadro. 16 | Resumen nacional de la producción de garbanzo porquero de temporal y riego del 2001 al 2005.                                                                             | 17 |
| Cuadro. 17 | Reacción de las líneas de garbanzo diferenciales a la inoculación con las distintas razas de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i>                             | 29 |
| Cuadro. 18 | Localidades muestreadas en el estado de Sinaloa.                                                                                                                         | 37 |
| Cuadro. 19 | Relación de aislamientos de las diferentes localidades de los estados de Guanajuato y Michoacán conservados en el laboratorio de biología molecular.                     | 40 |
| Cuadro. 20 | Secuencias de los iniciadores que se utilizaron en la PCR específica para la identificación de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i>                           | 44 |
| Cuadro. 21 | Reactivos, concentración del stock y volumen del stock utilizado para la identificación específica de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i>                          | 45 |
| Cuadro. 22 | Relación de iniciadores ISSR utilizados sobre los DNA de los aislamientos de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> de México y DNA de las razas 1,2,3,4, y 5 de USA. | 47 |
| Cuadro. 23 | Reactivos, concentración del stock y volumen utilizado para la amplificación selectiva de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i>                                      | 47 |
| Cuadro. 24 | Orden y volumen de reactivos para la digestión de DNA de cada aislamiento de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> analizado con AFLP.                         | 50 |
| Cuadro. 25 | Orden de medición y volumen de los componentes de ligación que se le agregó a cada tubo con DNA de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> digerido.                   | 51 |

|            |                                                                                                                                                                                                                                        |    |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Cuadro. 26 | Volumen de cada componente para la reacción de preamplificación de DNA de los aislamientos de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> evaluados.                                                                                     | 52 |
| Cuadro. 27 | Combinación preliminar de primer selectivos del Kit de AFLP usados como tratamientos sobre las muestras de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i>                                                                                   | 52 |
| Cuadro. 28 | Orden en que se realizaron las mediciones de los componentes por tratamiento (combinación de iniciadores) al que fueron sometidos las muestras evaluadas en AFLPs.                                                                     | 53 |
| Cuadro. 29 | Relación de aislamientos procedentes del estado de Guanajuato y Michoacán que se emplearon para amplificación y comparación de secuencias del gen <i>EF1<math>\alpha</math></i>                                                        | 57 |
| Cuadro. 30 | Secuencias del iniciador que amplifica intrones del gen del factor de elongación y de la traducción <i>1<math>\alpha</math></i> ( <i>EF1<math>\alpha</math></i> ) utilizado en el análisis de genealogías de <i>Fusarium oxysporum</i> | 59 |
| Cuadro. 31 | Reactivos, concentración del stock y volumen utilizado para la amplificación selectiva del gene del factor de elongación y de la traducción <i>1<math>\alpha</math></i> ( <i>EF1<math>\alpha</math></i> )                              | 59 |
| Cuadro. 32 | Variedades diferenciadoras utilizadas y su reacción a las razas conocidas de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i>                                                                                                           | 61 |
| Cuadro. 33 | Aislamientos que resultaron positivos en al identificación de <i>F. oxysporum</i> f. sp <i>ciceris</i> mediante pruebas de PCR específicas.                                                                                            | 65 |
| Cuadro. 34 | Iniciadores ISSR utilizados sobre los DNA de los aislamientos de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> de México y DNA de las razas 1,2,3,4, y 5 de USA.                                                                           | 67 |
| Cuadro. 35 | Combinación de primers selectivos de AFLP utilizados en la comparación de aislamientos de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> .                                                                                                  | 67 |

|            |                                                                                                                                                                                                                                        |    |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Cuadro. 36 | Formas especiales de <i>Fusarium oxysporum</i> aisladas de plantas de garbanzo afectadas de marchitamiento y amarillamiento que presentaron mayor similitud con las secuencias <i>EF1<math>\alpha</math></i> reportadas en el GenBank. | 75 |
| Cuadro. 37 | Reacción de las variedades a la inoculación de varias formas especiales de <i>F. oxysporum</i>                                                                                                                                         | 77 |
| Cuadro. 38 | Reacción de las plantas diferenciales al ser transplantadas en suelo infestado con <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> .                                                                                                   | 79 |

## ÍNDICE DE FIGURA

|                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Página |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Figura 1      Fluctuación del rendimiento en kg por hectárea del 2001 al 2001 de países que han presentado altos rendimientos                                                                                                                                                      | 7      |
| Figura 2      Evolución grafica de los principales exportadores de garbanzo en el mundo del 2001 al 2005.                                                                                                                                                                          | 9      |
| Figura 3      Electroforesis de 21 perfiles de ISSR evaluados en un aislamiento de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> .                                                                                                                                                     | 67     |
| Figura 4      Electroforesis de los productos de amplificación con el primer M1 de ISSR en los aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> .                                                                                                                   | 68     |
| Figura 5      Electroforesis de los productos de amplificación con los primers M3 y M6 de ISSR en los aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> .                                                                                                            | 68     |
| Figura 6      Electroforesis de los productos de amplificación de los primers ISSR M7 y M15 en los aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> .                                                                                                               | 69     |
| Figura 7      Agrupamiento de aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> de México respecto a las razas 1,2, 3, 4 y 5 de f. spp. <i>ciceris</i> con cinco iniciadores de ISSR agrupados por el método de UPGMA y el coeficiente de similaridad de Nei and Li. | 72     |
| Figura 8      Agrupamiento de aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> de México respecto a las razas 1, 2, 3, 4 y 5 de f. spp. <i>ciceris</i> con iniciadores de AFLP agrupados por el método de UPGMA y el coeficiente de similaridad de Nei and Li.      | 73     |

# DIFERENCIACIÓN FORMAS ESPECIALES DE *Fusarium oxysporum* CON MARCADORES GENÉTICO-MOLECULARES Y PRUEBAS DE PATOGENICIDAD

## DIFFERENTIATION OF RACES OF *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* AND OTHER FORMAE SPECIALES WITH GENETIC-MOLECULAR MARKERS AND PATHOGENICITY TEST

López López A.<sup>1</sup> y Valadez Moctezuma E.<sup>2</sup>

### RESUMEN

Existen ocho razas de *Fusarium oxysporum* Schlenchtend: Fr. f. sp. *ciceris* (Padwick) Mutuo & K. Sato (*Foc*) causando amarillamiento y marchitez en garbanzo (*Cicer arietinum* L). Se ha reportado este patógeno en México, pero ninguna raza. En este trabajo se estudiaron aislamientos de *Fusarium oxysporum* (*Fo*) de Sinaloa, Guanajuato y Michoacán obtenidos de campo. Para la separación de *Foc* de un total de 144 aislamientos de *Fo*, se realizó una amplificación selectiva con PCR, identificando 10 aislamientos como *Foc*; cuatro del estado de Guanajuato y seis Sinaloa. Estos aislamientos se contrastaron mediante marcadores ISSR y AFLP con las razas 1, 2, 3, 4 y 5 de *Foc* procedentes de USDA-USA. Ambos métodos ubicaron a los aislamientos de México con la raza cinco. De cuatro aislamientos de *Foc* evaluados en líneas diferenciales de garbanzo, dos causaron marchitez y muerte en la variedad JG-62, pero los otros solo causaron amarillamiento. Otros aislamientos de *Fo* capaces de dañar la variedad de garbanzo Blanco Sinaloa 92, pero no JG-62 se identificaron como *Fusarium oxysporum* f sp *lycopersici*, *cucumerinum*, *spinoceae* y *Netria ipomoeae* al comparar las secuencias del gen *EF1α*.

**Palabras claves:** ISSR, AFLAP, *Fusarium*, *ciceris*, razas.

### ABSTRACT

There are eight races of *Fusarium oxysporum* Schlenchtend: Fr. f. sp. *ciceris* (Padwick) Mutuo & K. Sato (*Foc*), causing wilt and yellowing in chickpea (*Cicer arietinum* L) plants. This pathogen has been reported from Mexican chickpea fields but no races have been identified yet. In the present study different (*Fo*) isolates from chickpea fields of Sinaloa, Guanajuato and Michoacán were worked out to separate *Foc* populations from 144 *Fo* isolation. Here specific PCR identification was performed getting 10 isolates with *Foc*; four from Guanajuato and six from Sinaloa states. These isolates were further compared against races 1, 2, 3, 4, and 5 of *Foc* from USDA (USA) using ISSR and AFLP markers. Both techniques grouped of the Mexican isolations with race 5 *Foc*. Also two isolates among the original 10 caused wilting and eventually death when inoculated on healthy differential plants of chickpeas (var. JG-62), and two more isolates caused yellowing only in the same differential plant. There were *Fo* isolates capable to produce damage on chickpea plant var. Blanco Sinaloa 92, but not on JG-62 plants, that were identify as *Fusarium oxysporum* f sp *lycopersici*, *cucumerinum*, *spinoceae*, and *Netria ipomoeae* trough partial sequences of *EF1α* gene.

**Key words:** ISSR, AFLP, *Fusarium*, *ciceris*, races

## I. INTRODUCCION

Se ha reportado que la marchitez y amarillamiento del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) causado por *Fusarium oxysporum* Schlenchtend: Fr. f. sp. *ciceris* (Padwick) Mutuo & K. Sato es una de las enfermedades que más ha causando perdidas en la producción de garbanzo en la mayoría de los países donde se cultiva. Entre los países en donde se ha diagnosticado esta enfermedad figuran Bangla Desh, Etiopía, India, México, Pakistán, Siria y Túnez (Halila y Strange, 1996). Chile, Irán, Sudán (Haware *et al.*, 1986a); Perú (Echandi, 1970), Malawi (Kannaiyan, 1981); EEUU (California) (Budennhagen y Workneh, 1988; Phillips, 1988); Italia (Frisullo *et al.*, 1989).

En España la enfermedad ocasionada por *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en el cultivo del garbanzo se le conoce como fusariosis, la cual es una de las principales limitantes de este cultivo en la región mediterránea y en el subcontinente Indio (Haware, 1990; Jiménez *et al.*, 1989b; Nene y Reddy, 1987), pudiendo ocasionar pérdidas anuales de rendimiento de 10-15 % en la India (Singh y Dahya, 1973) y España (Trapero y Jiménez, 1985), y la devastación completa del cultivo en condiciones determinadas (Halila y Strange, 1996).

En México, específicamente en el estado de Sinaloa, se le conoce como rabia del garbanzo a la marchitez aérea de las plantas, causado por el complejo de hongos patogénicos que se encuentran en el suelo y que su punto principal de penetración es la raíz; esta enfermedad se distribuye ampliamente en las zonas productoras de garbanzo del estado (Gómez *et al.*, 1998). De esta manera el campo experimental del INIFAP en el Valle de Culiacán ha enfocado sus estudios a fin de identificar los patógenos involucrados en la muerte de las plantas de garbanzo, de los cuales, los más agresivos resultaron ser *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* y *F. solani* (ASERCA, 1997). En investigaciones mas recientes, se ha verificado la presencia de *F. oxyporum* f. sp. *ciceris*

ocasionando serios daños a este cultivo en los estados de Guanajuato y Michoacán en donde concluyen la posible existencia de la raza 3, 4 y 5 de este patógeno en nuestro país (Luna, 2001; Beltrán, 2003). Sin embargo, no hay un trabajo de investigación que haya identificado al menos una raza en especial de este patógeno en nuestro país.

Aislar e identificar este patógeno mediante el empleo de plantas diferenciales, características morfológicas y otras herramientas taxonómicas exige tiempo y experiencia, requisitos que aun teniéndolos se corre el riesgo de equivocarse en la identificación respectiva debido a factores diversos. Afortunadamente se dispone de herramientas moleculares que emplean diferentes técnicas en el diagnóstico de hongos fitopatógenos. Para el caso de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, que presenta ocho razas fisiológicas: raza 0, raza 1A, raza 1 B/C, raza 2, raza 3 raza 4, raza 5 y raza, 6 (Jiménez , 2001) ha sido estudiado desde el punto de vista molecular; algunas de sus razas se han utilizado para desarrollar marcadores moleculares específicos y emplearlos como herramientas de diagnóstico sin recurrir a los trabajos tradicionales. El empleo de estas herramientas moleculares se traduce en ahorro de tiempo y precisión en la identificación del patógeno y por lo tanto en el manejo fitosanitario del cultivo, trayendo como resultado autosuficiencia alimentaria y seguridad nacional. Debido a que el género *Fusarium* es cosmopolita y, que puede sobrevivir en el suelo sobre materia orgánica o como estructuras de resistencia como las clamidosporas, e incluso es capaz de atacar a otras plantas en ausencia de su hospedante preferido, aislar e identificar correctamente al patógeno responsable de la enfermedad no es sencillo, razón por la cual, se plantea el presente trabajo con la siguiente hipótesis y objetivos.

## **1.1 HIPOTESIS**

Es posible la identificación de razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* presentes en México mediante comparaciones de perfiles moleculares con razas ya caracterizadas y/o identificadas.

## **1.2. OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar y comparar aislamientos de *Fusarium* de los estados de Sinaloa, Guanajuato y Michoacán provenientes de plantas de garbanzo desarrolladas en condiciones de campo.

### **1.2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Caracterización e identificación de aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* proveniente de plantas afectadas de los estados de Sinaloa, Guanajuato y Michoacán

Evaluar la patogenicidad de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* sobre plantas diferenciales de garbanzo bajo condiciones de invernadero

Caracterizar y comparar aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* de México con las razas fisiológicas 1, 2, 3, 4, y 5 de este patógeno procedentes de USA mediante ISSR y AFLP.

Verificar la patogenicidad de otras formas especiales aisladas de plantas de garbanzo con síntomas de fusariosis bajo de condiciones de invernadero.

## I I. REVISION DE LITERATURA

### 2.1 El cultivo del garbanzo

#### 2.1.1 Antecedentes

El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) es un cultivo muy antiguo que fue primeramente establecido en Turquía alrededor de 7000 A. C. Se cree que fue domesticado en Turquía de *C. reticulatum*, un pariente silvestre cercano. Después de su domesticación en el medio este, su cultivo se dispersó a través del Medio Este, la región del mediterráneo, India y Etiopia (Ladizinky, 1975; van der Maesen, 1987). Ocupa el tercer lugar entre las legumbres cultivadas en el mundo después de la arveja y frijoles con una área de 10, 374 miles de ha para una producción total de 7 123 miles de TM y un rendimiento promedio de 687 kg ha<sup>-1</sup> (FAO, 2003). Su introducción en México, Argentina, Chile, Perú, Australia y USA es relativamente reciente (Duke, 1981). Se considera que Cristóbal Colón introdujo el garbanzo en su segundo viaje a América en las antillas, pero debido a las condiciones ambientales poco favorables, los resultados en producción fueron poco alentadores. Posteriormente fue traído a México donde el potencial ecológico le fue favorable y en pocos años llegó a competir con el garbanzo que se producía en España (ASERCA, 1997).

A nivel mundial, el garbanzo es la segunda leguminosa en importancia después del frijol, esto debido a su alto valor nutritivo. En 100 gramos de semillas de garbanzo crudo se obtienen 375 calorías, 4.5-17.7% de humedad, 14.9-24.6 g de proteína (de entre las leguminosas, la proteína del garbanzo en grano es la de mejor calidad por su composición en aminoácidos), 0.8-6.4 % de grasa, 2.1-11.7 g de fibra, 2-4.8 g de cenizas, 140-440 mg de Ca, 190-382 mg de P, 5.0-23.9 mg de F, 0-225 µg de β-carotenos equivalente a 0.21-1.1 mg de tiamina, 0.12-0.33 mg de riboflavina, y 1.3-2.9 mg de niacina (Duke, 1981, Huisman y Van der Poel, 1994). Además, contiene

vitaminas del complejo B (De Miguel, 1991; Haware, 1998) y es casi tan rico en glúcidos como los cereales, que junto con ellos, son los alimentos más pobres en agua y son los más ricos en fibra.

De acuerdo las características morfológicas de la planta y semilla, el garbanzo se divide en dos tipos; Desi y Kabuli. Esta leguminosa se cultiva en invierno en la India, Etiopía y Sudamérica y en la primavera en la región del Mediterráneo (De Miguel, 1991). Al practicarse como cultivo de invierno, no interfiere con otros cultivos importantes de verano o primavera, permitiendo una rotación con cereales; y como puede completar su ciclo vegetativo y producir cosecha aun en condiciones de escasa humedad en el suelo, su costo de producción es bajo, comparado con otros cultivos. (Crispín y López, 1976).

### **2.1.2 Origen y distribución del garbanzo**

El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) cuyo nombre *Cicer* es de origen latino, derivado de la palabra preindogermana kichere usada por la tribu del norte de Grecia, y *arietinum* que tal vez corresponda a la traducción del griego que significa carnero, aludiendo a la forma de la semilla a la cabeza de un carnero (Aries). El género *Cicer* es originario del sureste de Turquía de la zona limítrofe con Siria, en tanto que Vavilov establece dos centros primarios; el suroeste de Asia y la Cuenca del Mediterráneo (De Miguel, 1991)

Se clasifican dos grupos principales de garbanzo; el Kabuli (Blanco) que llegó a la India a través de Afganistán, cuyo nombre indú es kabuli chana; chana significa garbanzo y kabuli alude a Kabul capital Afgana; Desi que significa local (De Miguel, 1991)

### **2.1.3 Importancia económica mundial del garbanzo**

La producción mundial de garbanzo ha tenido importantes fluctuaciones variando de un rango que va de 4.85 a 9.22 millones de toneladas métricas que se obtuvieron en 1980 y 1999, respectivamente. Este incremento en la producción está más ligado con aumento en la superficie cosechada y no a un incremento en el rendimiento

Durante el periodo de 1998 a 2000, la producción se concentró en 6 países: India, Pakistán, Turquía, Canadá, Irán y México, que en conjunto produjeron el 90.5 % del total de garbanzo en el mundo.

Históricamente, la superficie cosechada mundial de garbanzo entre 1980 y 2000 ha estado entre 8.73 y 12.02 millones de hectáreas, con una superficie promedio anual de 10.27 millones de hectáreas cosechadas. El rendimiento mundial varía de 0.50 a 0.80 ton ha<sup>-1</sup> con un rendimiento promedio anual de 0.70 ton ha<sup>-1</sup>. De 1998 a 2000, los países que cosecharon la mayor superficie en orden de importancia fueron India, Pakistán, Turquía, Irán y Australia; quines en su conjunto cosecharon alrededor del 90% de la superficie total de garbanzo. México ha ocupado el séptimo lugar en cuanto a superficie cosechada, mientras que Etiopía se ha ubicado en el sexto lugar.

Es importante aclarar que los principales países en cuanto a superficie cosechada no ocupan el mismo lugar en materia de productividad, en razón de técnicas inadecuadas de cultivo, la falta de uso de semilla mejorada, fertilizantes y problemas climatológico. De esta forma tenemos que de 1998 a 2000 los países con mejor producción en orden de importancia fueron China, Líbano, Israel, Egipto y Sudan, los cuáles cosecharon en promedio 3.1, 2.4, 1.7 y 1.6 ton ha<sup>-1</sup>, respectivamente. Estos datos representaron un 287, 200, 150, 112.2 y 100 % superior al promedio anual de 0.8 ton ha<sup>-1</sup>. En tanto que México ocupó el XIV lugar en producción para ese mismo periodo al cosechar 1.2 ton ha<sup>-1</sup>, que representó 50% superior al promedio (Anónimo 2001).

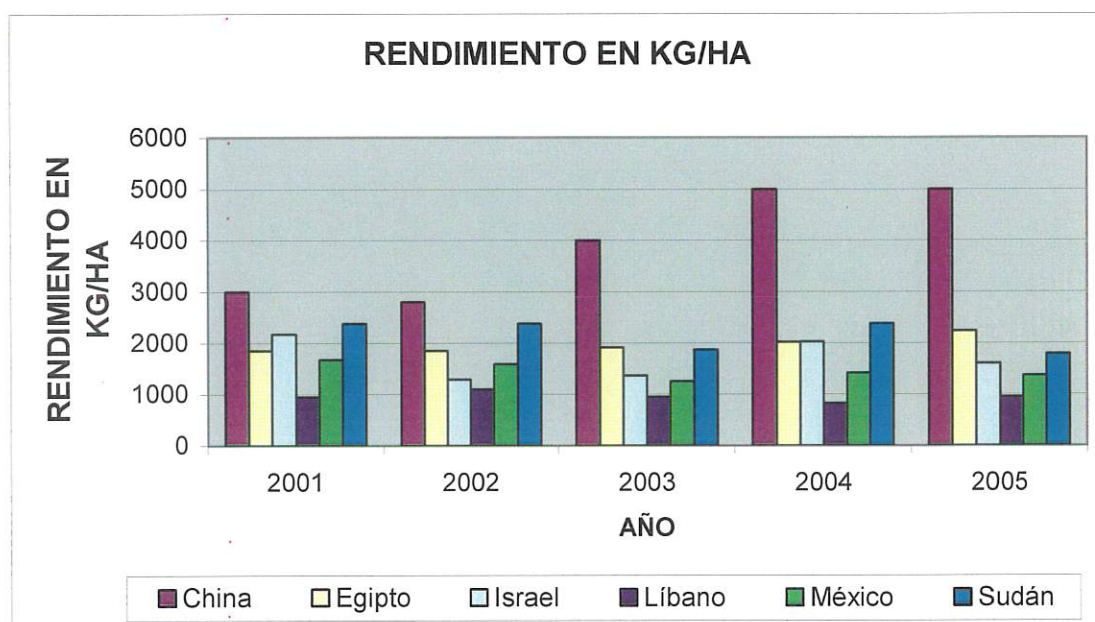
Al revisar nuevamente los niveles de producción de los países que reportaron altos índices de rendimiento por hectárea, encontramos que del 2001 a 2005 (Cuadro 1) China sigue ocupando el primer lugar al obtener rendimientos que van desde 2.8 a 5 toneladas por hectárea, seguido por Egipto e Israel respectivamente (Figura 1).

Cuadro 1. Rendimiento en kg por hectárea del 2001 al 2005 para aquellos países que en años anteriores presentaron altos índices de rendimiento.

| AÑO  | China | Egipto | Israel | Líbano | México | Sudán  |
|------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 2001 | 5000  | 2017.3 | 2025.2 | 828.7  | 1413.9 | 2380.2 |
| 2002 | 5000  | 2238.1 | 1606.3 | 950    | 1370.6 | 1785.6 |
| 2003 | 4000  | 1916.5 | 1369   | 955.3  | 1248.3 | 1870.1 |
| 2004 | 3000  | 1848.3 | 2170.4 | 950    | 1677   | 2381   |
| 2005 | 2800  | 1851.6 | 1289.7 | 1091.7 | 1595.4 | 2381.3 |

Fuente: Sistema de información estadística de la FAO. 2007.

Figura 1. Fluctuación del rendimiento en kg por hectárea del 2001 al 2005 de países que han presentado altos rendimientos.



Fuente: Gráfica generada a partir de datos del sistema de información estadístico de la FAO. 2007.

#### 2.1.4 Estacionalidad de la oferta a en el mundo.

No se dispone de información de las épocas del año en que se realizan las labores de siembra, desarrollo y cosecha del garbanzo para cada país debido a la extensa variación de características geográficas y climatológicas; sin embargo, sí se dispone de un calendario de la cosecha de garbanzo para los países que tienen más influencia en la

comercialización mundial de este grano: Australia, Turquía y México; así como de los principales clientes del garbanzo de México: España y Estados Unidos. Por su estacionalidad, el garbanzo mexicano es el primero que sale al mercado internacional en el año durante los meses de abril, mayo y junio. En virtud de la convergencia de algunos periodos de cosecha entre los países antes mencionados, existe competencia de las cosechas de México con las de España y Estados Unidos durante el mes de Junio, entre las cosechas de España y de EU en el mes de Julio y entre las cosechas de Turquía y Australia en los meses de septiembre, octubre y noviembre. México tiene una importante ventana de oportunidad en los meses de abril y mayo cuando no ha entrado la producción española y ni la estadounidense (Anónimo, 2001)

### **2.1.5 Exportadores de garbanzo**

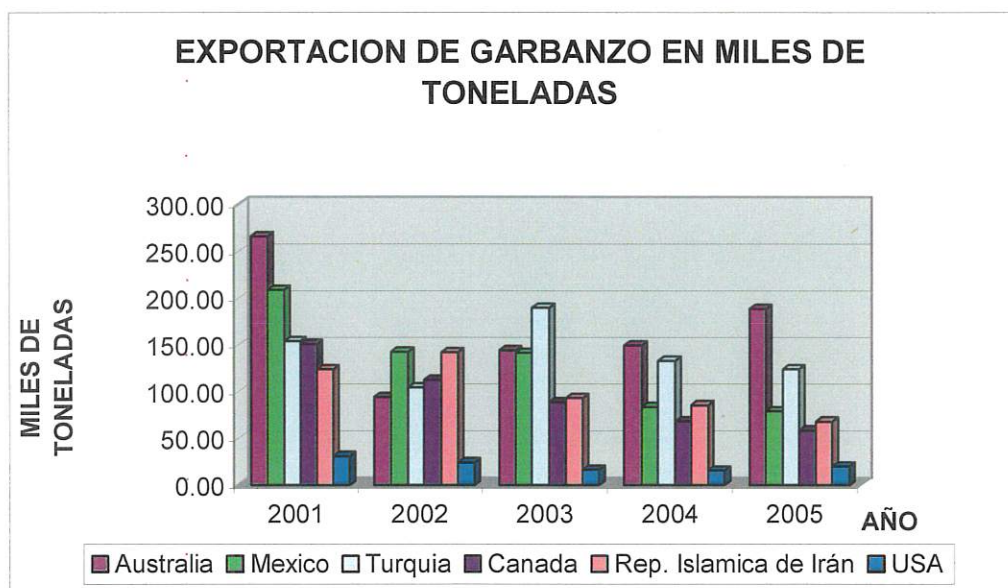
El comercio mundial de garbanzo está dominado por unos cuantos países. Del periodo de 1996 a 1999, los principales exportadores fueron Australia y Turquía quienes participaron con el 34.7% y 27.9% de la exportaciones mundiales de garbanzo durante dicho periodo. En tanto que México ocupó el tercer lugar en el mismo periodo con 19.5%. El cuarto lugar lo tuvo Irán, le siguieron Estados Unidos y Canadá con 8 %, 1.3% 1.1% de las exportaciones respectivamente. Es importante mencionar que en 1999 México desplazó a Australia y a Turquía como principales exportadores gracias a la utilización de semillas mejoradas y producción de distintas variedades, lo que ha dado al garbanzo mexicano reconocimiento mundial y acceso a distintos mercados (Anónimo, 2001). Sin embargo, la situación del garbanzo mexicano en el mercado internacional no ha mejorado, pues del 2001 al 2005 siguió ocupando el tercer lugar en volumen de exportación al ser superado por Australia seguido de Turquía. Los datos de producción (Cuadro 2) muestran que durante el 2003 (Figura 2) Turquía superó a Australia y a México en volumen de garbanzo exportado al mercado mundial. Después de ese año y con datos disponibles hasta el 2005, Turquía se ha mantenido como segundo país exportador de garbanzo en grano

Cuadro 2 Volumen de exportación de garbanzo en miles de toneladas por los principales países exportadores durante el periodo 2001-2005

| PAIS                       | 2001   | 2002   | 2003   | 2004   | 2005   |
|----------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Australia                  | 266.66 | 94.25  | 144.09 | 149.39 | 188.42 |
| Canadá                     | 208.96 | 142.68 | 141.38 | 83.25  | 79.03  |
| Estados Unidos de América  | 154.22 | 104.71 | 189.61 | 133.15 | 123.61 |
| República Islámica de Irán | 151    | 112.46 | 88.8   | 68.38  | 58.22  |
| México                     | 123.61 | 142.08 | 92.95  | 85.5   | 67.89  |
| Turquía                    | 30.92  | 24.08  | 16.36  | 15.39  | 19.81  |

Fuente: Datos estadísticos de la FAO. 2007

Figura 2 Evolución gráfica de los principales exportadores de garbanzo en el mundo del 2001 al 2005.



Fuente: Gráfica generada a partir de datos del sistema de información estadístico de la FAO. 2007.

### 2.1.6 Importancia del garbanzo en México

Debido a la gran variedad de climas y suelos que presenta la República Mexicana, es posible cultivar una gran variedad de productos agrícolas, con excelentes rendimientos y cumpliendo con los estándares de calidad que exige el mercado internacional. Uno de esos productos es el garbanzo, el cual es considerado hoy día como el mejor del mundo.

Con una tradición de muchos años, tanto el sector productivo como el que realiza la comercialización, ha ido definiendo estrategias y programas dando como resultado que nuestro país cuente con ventajas frente a nuestros principales competidores como Turquía y Australia. Gracias a la alta mecanización tanto en condiciones de riego como de temporal, así como la estrecha vinculación entre el sector productivo y el de investigación, han permitido que hoy el 95% de la superficie cultivada se realice con variedades generadas en nuestro país logrando con ello que productores y comercializadores mantengan la calidad del producto. De tal forma que los consumidores de Centro y Sudamérica, de Europa y de Asia, aprecian y reconocen el producto de origen mexicano (ASERCA, 1997)

#### **2.1.7. La evolución del garbanzo en México**

En México se cultivan dos variedades según el tamaño y el color: a) el garbanzo café y pequeño, denominado porquero o forrajero, destinado casi en su totalidad a la alimentación de cerdos, ganado lechero y pollo; b) el garbanzo tipo blanco y grande para consumo humano, destinado en su mayoría a la exportación. La producción de garbanzo en nuestro país ha tenido prácticamente dos momentos, que podríamos caracterizarlos de la siguiente forma: a) un proceso de reconversión de garbanzo forrajero a garbanzo blanco y b) y un proceso de relocalización de la producción del garbanzo blanco. De ésta manera tenemos que durante la primera década de los setentas y hasta los tres primeros años de los ochentas, el mayor porcentaje de la producción de garbanzo y áreas destinadas a su cultivo fue para la variedad forrajera; en promedio 191.623 has, del cual el 70.2 % correspondió al forrajero y el resto al comestible. Sin embargo, a partir de 1984 la tendencia se revirtió y el garbanzo blanco pasó a ocupar el 63.39 % del total producido, como consecuencia del cambio de cultivos que se originó en la zona del Bajío. A la par se produjo otro proceso, nos referimos a la relocalización de la producción de garbanzo blanco que se dio a partir de la primera mitad de la década de los 80 ya que la principal zona productora se ubicaba en la zona del Bajío y para los

años posteriores se desplazó al noroeste. En los años 80, los estados de Guanajuato, Jalisco y Michoacán estaban considerados como los principales productores. Sin embargo a mediados de esa época debido al cambio de patrón de cultivos de esas entidades, la producción del garbanzo se desplazó a la Baja California Sur, Sinaloa, y Sonora, en dónde ha encontrado condiciones satisfactorias para su expansión y sobre todo como cultivo de exportación. A partir de entonces, la producción de garbanzo se ubica en áreas bien definidas; por un lado encontramos a la zona noroeste que en la actualidad aporta las dos terceras partes de la producción y por otro lado la región del Bajío que contribuye con un poco menos que la tercera parte. La producción restante se distribuye en siete entidades del país: Hidalgo, Guerrero, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Veracruz y Zacatecas (ASERCA, 1997).

En síntesis, se cultiva dos tipos de garbanzo; el Desi y Kabuli en regiones bien delimitadas. La región del Bajío que comprende los estados de Guanajuato, San Luis Potosí, Querétaro, Michoacán y Jalisco, producen el 90% del garbanzo tipo Desi (marrón) denominado localmente “porquero o forrajero” y solo un 10 % de su superficie se destina a la producción de grano tipo Kabuli (Blanco). En el Noroeste del país (Sonora, Baja California Sur y Sinaloa) se cultiva el garbazo tipo Kabuli, del cual, el 90 % se destina a la exportación (ASERCA, 1997).

A continuación se presenta en cuadros resumen y desglosados por entidad federativa, información relacionada a la producción del cultivo del garbanzo en superficie dedicada a su cultivo en la República Mexicana y las categorías en las fueron clasificadas.

Cuadro 3. Producción de garbanzo grano blanco por entidad federativa de temporal y riego en el 2004

| ESTADO          | SS(Ha)           | SC (Ha)          | P (Ton)           | R(Ton/Ha)   | PRM (\$/Ton)    | VP (Miles de \$)  |
|-----------------|------------------|------------------|-------------------|-------------|-----------------|-------------------|
| Sinaloa         | 36,768.00        | 36,482.00        | 55,735.00         | 1.53        | 8,596.47        | 479,124.30        |
| Sonora          | 12,532.00        | 12,522.00        | 21,783.00         | 1.74        | 7,942.80        | 173,018.10        |
| Guanajuato      | 9,460.00         | 9,220.00         | 8,240.60          | 0.89        | 2,198.85        | 18.12             |
| Michoacán       | 6,986.30         | 6,873.92         | 7,190.78          | 1.05        | 3,719.60        | 26,746.86         |
| Oaxaca          | 4,525.00         | 4,525.00         | 3,169.00          | 0.70        | 4,002.68        | 12,684.50         |
| B. C Sur        | 2,178.00         | 2,178.00         | 3,043.00          | 1.40        | 10,985.21       | 33.43             |
| Jalisco         | 1,754.00         | 1,271.00         | 4,665.00          | 3.67        | 2,597.49        | 12,117.28         |
| Guerrero        | 718.00           | 718.00           | 475.00            | 0.66        | 5,699.71        | 2,707.36          |
| S L Potosí      | 55.00            | 55.00            | 147.50            | 2.68        | 3,082.37        | 454.65            |
| Hidalgo         | 30.00            | 30.00            | 30.00             | 1.00        | 7,000.00        | 210.00            |
| Querétaro       | 29.00            | 29.00            | 28.00             | 0.97        | 2,485.71        | 69.60             |
| Chiapas         | 25.00            | 25.00            | 20.00             | 0.80        | 8,000.00        | 0.16              |
| <b>TOTAL</b>    | <b>75,060.30</b> | <b>73,928.92</b> | <b>104,526.88</b> | <b>1.41</b> | <b>7,259.76</b> | <b>758,840.50</b> |
| Región Centro   | 30.00            | 30.00            | 30.00             | 1.00        | 7,000.00        | 210.00            |
| R C Occidente   | 18,284.30        | 17,448.92        | 20,271.88         | 1.16        | 2,836.85        | 57,508.24         |
| Región Noroeste | 51,478.00        | 51,182.00        | 80,561.00         | 1.57        | 8,509.95        | 685,570.40        |
| Región Sureste  | 5,268.00         | 5,268.00         |                   | 0.70        | 4,244.50        | 15,551.86         |

FUENTE: Sistema de Información Agropecuaria de Consulta (SIACON).

Cuadro 4. Resumen nacional de producción de garbanzo grano blanco en la República Mexicana del 2001 al 2005

| Variable         | 2001         | 2002       | 2003       | 2004       | 2005       |
|------------------|--------------|------------|------------|------------|------------|
| SS (Ha)          | 194,484.93   | 150,572.96 | 116,873.53 | 75,060.30  | 110,105.91 |
| SC (Ha)          | 192,047.93   | 147,337.45 | 114,376.44 | 73,928.92  | 97,750.91  |
| P (Ton)          | 323,566.15   | 235,053.28 | 142,782.19 | 104,526.88 | 133,975.82 |
| R (Ton/Ha)       | 1.69         | 1.60       | 1.25       | 1.41       | 1.37       |
| PMR(/Ton)        | 4,623.35     | 3,912.31   | 4,053.93   | 7,259.76   | 7,113.71   |
| VP (Miles de \$) | 1,495,960.52 | 919,601.77 | 578,829.18 | 758,840.50 | 953,064.64 |

FUENTE: Sistema de Información Agropecuaria de Consulta (SIACON).

Cuadro 5. Producción de garbanzo grano por entidad federativa de riego y temporal del 2003

| Estado       | SS (Ha)      | SC (Ha)      | P (Ton)      | R (Ton/Ha)  | PMR (\$/Ton)    | VP(Miles de \$) |
|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|-----------------|-----------------|
| OAXACA       | 25.00        | 25.00        | 18.00        | 0.720       | 4,555.56        | 82.00           |
| <b>TOTAL</b> | <b>25.00</b> | <b>25.00</b> | <b>18.00</b> | <b>.720</b> | <b>4,555.56</b> | <b>82.00</b>    |

FUENTE: Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera, SAGARPA, 2006.

Cuadro 6. Producción de garbanzo grano por entidad federativa de riego y temporal en el 2001.

| Estado       | SS (Ha)         | SC (Ha)         | P (Ton)         | R (Ton/Ha)  | PMR (\$/Ton)    | VP(Miles de \$)  |
|--------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------|-----------------|------------------|
| Guanajuato   | 4,648.89        | 4,648.89        | 4,442.16        | 0.956       | 2,321.95        | 10,314.48        |
| Sinaloa      | 2,427.00        | 2,416.00        | 2,553.00        | 1.057       | 4,500.00        | 11,488.50        |
| Guerrero     | 645.00          | 645.00          | 375.00          | 0.581       | 3,588.36        | 1,345.64         |
| Hidalgo      | 80.00           | 80.00           | 165.00          | 2.063       | 4,636.36        | 765.00           |
| Nayarit      | 25.00           | 25.00           | 13.00           | 0.520       | 5,000.00        | 65.00            |
| Nuevo León   | 35.00           | 35.00           | 25.00           | 0.714       | 5,840.00        | 146.00           |
| Querétaro    | 24.00           | 24.00           | 30.00           | 1.250       | 3,483.33        | 104.50           |
| S. L. Potosí | 24.00           | 22.00           | 50.90           | 2.314       | 3,000.00        | 152.70           |
| <b>TOTAL</b> | <b>5,481.89</b> | <b>5,479.89</b> | <b>5,101.06</b> | <b>.931</b> | <b>2,527.58</b> | <b>12,893.32</b> |

FUENTE: Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera, SAGARPA, 2006.

Cuadro 7. Resumen nacional de la producción de garbanzo grano de riego y temporal del 2001 al 2005

| Variable         | 2001      | 2002 | 2003     | 2004 | 2005 |
|------------------|-----------|------|----------|------|------|
| SS (Ha)          | 2,427.00  | -    | 25.00    | -    | -    |
| SC (Ha)          | 2,416.00  | -    | 25.00    | -    | -    |
| P (Ton)          | 2,553.00  | -    | 18.00    | -    | -    |
| R (Ton/Ha)       | 1.06      | -    | 0.72     | -    | -    |
| PMR(/Ton)        | 4,500.00  | -    | 4,555.56 | -    | -    |
| VP (Miles de \$) | 11,488.50 | -    | 82.00    | -    | -    |

FUENTE: Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera, SAGARPA, 2006

Cuadro 8. Producción de garbanzo forrajero por entidad federativa de riego y temporal del 2001

| Delegación   | SS (HA)          | SC (Ha)          | P (Ton)          | R (Ton/Ha)   | PMR (\$Ton)     | VP (Miles de \$)  |
|--------------|------------------|------------------|------------------|--------------|-----------------|-------------------|
| Jalisco      | 22,486.50        | 22,474.50        | 69,233.03        | 3.081        | 1,364.41        | 94,462.10         |
| S L Potosí   | 2,891.00         | 2,891.00         | 4,228.70         | 1.463        | 2,109.78        | 8,921.64          |
| Guanajuato   | 1,028.00         | 1,013.00         | 991.87           | 0.979        | 2,079.79        | 2,062.88          |
| Michoacán    | 471              | 471              | 3,351.00         | 7.115        | 1,095.51        | 3,671.05          |
| Querétaro    | 358              | 358              | 101              | 0.282        | 2,500.00        | 252.5             |
| Nayarit      | 268.25           | 268.25           | 731.5            | 2.727        | 1,850.17        | 1,353.40          |
| Zacatecas    | 2.00             | 2.00             | 5.00             | 2.500        | 1,600.00        | 8.00              |
| <b>Total</b> | <b>27,504.75</b> | <b>27,477.75</b> | <b>78,642.10</b> | <b>2.862</b> | <b>1,408.04</b> | <b>110,731.57</b> |

FUENTE: Sistema de Información Agropecuaria de Consulta (SIACON).

Cuadro 9. Producción de garbanzo forrajero por entidad federativa en la modalidad de riego y temporal del 2002

| Delegación   | SS (HA)          | SC (Ha)          | P (Ton)          | R (Ton/Ha)   | PMR (\$Ton)     | VP (Miles de \$) |
|--------------|------------------|------------------|------------------|--------------|-----------------|------------------|
| Jalisco      | 19,594.60        | 19,410.10        | 53,676.56        | 2.765        | 1,477.25        | 79,293.51        |
| S. L. Potosí | 3,615.00         | 3,615.00         | 4,730.50         | 1.309        | 1,979.43        | 9,363.69         |
| Guanajuato   | 879              | 567              | 752.3            | 1.327        | 1,760.53        | 1,324.45         |
| Michoacán    | 139.25           | 139.25           | 1,202.00         | 8.632        | 1,156.66        | 1,390.30         |
| Nayarit      | 135.5            | 70.5             | 159              | 2.255        | 1,575.47        | 250.5            |
| Querétaro    | 41               | 41               | 49               | 1.195        | 2,146.94        | 105.2            |
| Zacatecas    | 2                | 2                | 20               | 10           | 1,900.00        | 38               |
| Colima       | 2.00             | 0.00             | 0.00             | 0.00         | 0.00            | 0.00             |
| <b>Total</b> | <b>24,408.35</b> | <b>23,844.85</b> | <b>60,589.36</b> | <b>2.541</b> | <b>1,514.55</b> | <b>91,765.65</b> |

FUENTE: Sistema de Información Agropecuaria de Consulta (SIACON).

Cuadro 10. Producción de garbanzo forrajero por entidad federativa en la modalidad de riego y temporal del 2003

| Delegación             | SS (Ha)          | SC (Ha)          | P (Ton)          | R (Ton/Ha)   | PMR (Ton)       | VP (Miles de \$)  |
|------------------------|------------------|------------------|------------------|--------------|-----------------|-------------------|
| Jalisco                | 23,402.00        | 23,389.00        | 69,989.49        | 2.992        | 1,409.84        | 98,674.01         |
| Michoacán              | 5,812.87         | 5,070.62         | 16,489.36        | 3.252        | 1,321.17        | 21,785.30         |
| S. L. Potosí           | 4,603.00         | 4,161.00         | 4,923.40         | 1.183        | 2,060.23        | 10,143.34         |
| Guanajuato             | 2,732.00         | 2,192.00         | 1,725.40         | 0.787        | 1,797.01        | 3,100.57          |
| Querétaro              | 253              | 253              | 165              | 0.652        | 2,000.00        | 330               |
| Nayarit                | 191              | 191              | 451.5            | 2.364        | 2,043.19        | 922.5             |
| B California           | 2                | 2                | 4                | 2            | 800             | 3.2               |
| Zacatecas              | 1                | 1                | 1                | 1            | 1,300.00        | 1.3               |
| <b>Total</b>           | <b>36,996.87</b> | <b>35,259.62</b> | <b>93,749.15</b> | <b>2.659</b> | <b>1,439.59</b> | <b>134,960.22</b> |
| Región C.<br>Occidente | 36,994.87        | 35,257.62        | 93,745.14        | 2.66         | 1,439.62        | 134,957.02        |
| R. Noroeste            | 2.00             | 2.00             | 4.00             | 2.00         | 800.00          | 3,200.00          |

FUENTE: Sistema de Información Agropecuaria de Consulta (SIACON).

Cuadro 11. Producción de garbanzo forrajero por entidad federativa en la modalidad de riego y temporal del 2004

| Delegación   | SS (Ha)          | SC (Ha)          | P (Ton)          | R (Ton/Ha)   | PMR (\$Ton)     | VP (Miles de \$) |
|--------------|------------------|------------------|------------------|--------------|-----------------|------------------|
| Jalisco      | 13,236.00        | 12,930.00        | 27,003.00        | 2.088        | 1,587.10        | 42,856.52        |
| Michoacán    | 4,717.44         | 3,665.94         | 12,000.59        | 3.274        | 1,722.23        | 20,667.80        |
| S. L. Potosí | 3,091.00         | 2,608.00         | 2,839.70         | 1.089        | 3,229.69        | 9,171.35         |
| Guanajuato   | 2,163.00         | 1,746.00         | 1,495.20         | 0.856        | 1,808.47        | 2,704.03         |
| Querétaro    | 222.00           | 222              | 126              | 0.568        | 2,100.00        | 264.6            |
| Nayarit      | 86.00            | 86               | 222.75           | 2.59         | 2,000.00        | 445.5            |
| Zacatecas    | 2.00             | 2                | 11               | 5.5          | 3,036.36        | 33.4             |
| <b>Total</b> | <b>23,517.44</b> | <b>21,259.94</b> | <b>43,698.24</b> | <b>2.055</b> | <b>1,742.48</b> | <b>76,143.20</b> |

FUENTE: Sistema de Información Agropecuaria de Consulta (SIACON).

Cuadro 12. Producción de garbanzo forrajero por entidad federativa en la modalidad de riego y temporal del 2005

| Delegación   | SS (Ha)          | SC (Ha)          | P (Ton)          | R (Ton/Ha)   | PMR (\$Ton)     | VP (Miles de \$) |
|--------------|------------------|------------------|------------------|--------------|-----------------|------------------|
| Jalisco      | 14,271.00        | 14,181.00        | 36,393.67        | 2.566        | 1,528.74        | 55,636.50        |
| Michoacán    | 5,059.00         | 5,059.00         | 14,785.95        | 2.923        | 1,007.01        | 14,889.55        |
| S. L. Potosí | 4,042.00         | 3,445.00         | 3,968.40         | 1.152        | 2,556.69        | 10,145.96        |
| Guanajuato   | 2,813.00         | 2,798.00         | 2,665.20         | 0.953        | 1,687.57        | 4,497.70         |
| Sinaloa      | 1,110.00         | 539              | 349              | 0.647        | 1,200.00        | 418.8            |
| Nayarit      | 66.5             | 66.5             | 125.25           | 1.883        | 2,000.00        | 250.5            |
| Querétaro    | 35               | 35               | 11               | 0.314        | 2,172.73        | 23.9             |
| N. León      | 8                | 8                | 6.4              | 0.8          | 600             | 3.84             |
| B California | 4                | 4                | 12               | 3            | 900             | 10.8             |
| <b>Total</b> | <b>27,408.50</b> | <b>26,135.50</b> | <b>58,316.87</b> | <b>2.231</b> | <b>1,472.60</b> | <b>85,877.55</b> |

FUENTE: Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera, SAGARPA, 2006.

Cuadro 13. Resumen nacional de la producción garbanzo forrajero de riego y temporal del 2001 al 2005.

| VARIABLE                        | 2001       | 2002      | 2003       | 2004      | 2005      |
|---------------------------------|------------|-----------|------------|-----------|-----------|
| Superficie Sembrada (Ha.)       | 27,504.75  | 24,408.35 | 36,996.87  | 24,496.44 | 28,934.50 |
| Superficie Cosechada (Ha.)      | 27,477.75  | 23,844.85 | 35,259.62  | 22,238.94 | 27,661.50 |
| Volumen Producción (Ton.)       | 78,642.10  | 60,589.36 | 93,749.14  | 45,150.74 | 60,788.22 |
| Valor Producción en 1000 ( \$ ) | 110,731.57 | 91,765.65 | 134,960.22 | 78,559.80 | 93,206.33 |
| Rendimiento (Ton. / Ha.)        | 2.86       | 2.54      | 2.66       | 2.03      | 2.20      |
| Precio Medio Rural ( \$ / Ton.) | 1,408.04   | 1,514.55  | 1,439.59   | 1,739.94  | 1,533.30  |

FUENTE: Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera, SAGARPA, 2006.

Cuadro 14. Producción de garbanzo porquero por entidad federativa de riego y temporal en el 2004.

| Delegación   | SS (Ha)       | SC (Ha)       | P (Ton)         | R (Ton/Ha)   | PMR (\$Ton)     | VP (Miles de \$) |
|--------------|---------------|---------------|-----------------|--------------|-----------------|------------------|
| JALISCO      | 979.00        | 979.00        | 1,452.50        | 1.484        | 1,663.75        | 2,416.60         |
| <b>TOTAL</b> | <b>979.00</b> | <b>979.00</b> | <b>1,452.50</b> | <b>1.484</b> | <b>1,663.75</b> | <b>2,416.60</b>  |

FUENTE: Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera, SAGARPA, 2006.

Cuadro 15 Producción de garbanzo porquero por entidad federativa de riego y temporal en el 2005.

| Delegación   | SS (Ha)         | SC (Ha)         | P (Ton)         | R (Ton/Ha)   | PMR (\$Ton)     | VP (Miles de \$) |
|--------------|-----------------|-----------------|-----------------|--------------|-----------------|------------------|
| JALISCO      | 1,526.00        | 1,526.00        | 2,471.35        | 1.619        | 2,965.50        | 7,328.78         |
| <b>TOTAL</b> | <b>1,526.00</b> | <b>1,526.00</b> | <b>2,471.35</b> | <b>1.619</b> | <b>2,965.50</b> | <b>7,328.78</b>  |

FUENTE: Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera, SAGARPA, 2006.

Cuadro.16 Resumen nacional de la producción de garbanzo porquero de temporal y riego del 2001 al 2005.

| Variable         | 2001 | 2002 | 2003 | 2004     | 2005     |
|------------------|------|------|------|----------|----------|
| SS (Ha)          | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 979.00   | 1,526.00 |
| SC (Ha)          | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 979.00   | 1,526.00 |
| P (Ton)          | .00  | 0.00 | 0.00 | 1,452.50 | 2,471.35 |
| R (Ton/Ha)       | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 1.48     | 1.62     |
| PMR(/Ton)        | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 1,663.75 | 2,965.50 |
| VP (Miles de \$) | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 2,416.60 | 7,328.78 |

FUENTE: Sistema de Información Agropecuaria de Consulta (SIACON).

SS (Ha): Superficie Sembrada por Hectárea; SC (Ha): Superficie Cosechada por Hectárea; P (Ton): Producción en Toneladas; R (Ton/Ha): Rendimiento en Toneladas por Hectárea; PMR (\$Ton): Precio Medio Rural en \$ por Tonelada; VP (Miles de \$): Valor de la Producción en Miles de Pesos Mexicanos

### 2.1.8 Características botánicas del cultivo

El garbanzo pertenece a la siguiente categoría taxonómica.

División: Spermatophyta.

Clase: Dicotilidoneae

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae

Subfamilia: Papilionoidae.

Tribu: Ciceracea

Genero: Cicer

Especie *Cicer arietinum* L

La planta del garbanzo alcanza una altura de 30 a 70 cm de altura. Su hábito de crecimiento varía de erecto a rastrero, es velluda y granulosa, presenta hojas emparipinadas sin zarcillos (hojas con número de folíolos impares) y uniformemente epuvinadas con folíolos dentados típicos y estípulas (apéndices que se forman a cada lado de la base foliar) lanceoladas y dentadas; cada hoja compuesta presenta de 11 a 15 folíolos y su tamaño varía de 8 a 17 mm de longitud. El tallo es cilíndrico en la parte hipogea y se convierte en prismático y veloso a partir del primer nudo, mide de 1 a 3 cm de diámetro, se bifurca sobre la superficie del suelo y no se distingue un tallo principal, existiendo ramas primarias, secundarias y terciarias; es decir, un total de 3 a 10 ramas principales. Las plantas presentan flores pequeñas aisladas o dobles ubicadas en pedúnculos que salen de las axilas de las hojas; son blancas, violetas, azul celeste o rosadas según la variedad; tienen la corola formada por 5 pétalos desiguales y 10 estambres de los cuales 9 están soldados (Coronel, 1980; Andrade, 1989 y De Miguel, 1991).

El fruto corresponde a vainas infladas, pubescentes, los cuales presentan de 1 o 2 semillas. Las semillas comúnmente son globosas y ligeramente aplastadas y lobuladas por un lado, sus colores varían según la variedad; los hay blanco, mate, crema, marrón, rojizo y negro. El tamaño también es variable; las semillas grandes pesan 0.5 gramos o más y las pequeñas 0.15 gramos o menos, encontrándose también tamaños intermedios (Crispín y López, 1976).

La raíz es fibrosa con un eje principal más grueso que las raíces secundarias y terciarias. Algunas de las raíces secundarias también son gruesas. En la raíz se producen nódulos ramificados muy grandes, que contienen bacterias de *Rhizobium leguminosarum* que fijan el nitrógeno atmosférico (Andrade, 1989).

Las raíces son fuertes y desarrolladas, varían de acuerdo a la especie que se trate, el sistema radical es profundo o superficial (desde 1 a 2m), esta parece ser la razón principal de su resistencia a la sequía (De Miguel, 1991 y Barreto, 2001).

Dependiendo de las condiciones ambientales, el ciclo del garbanzo puede tener un periodo comprendido entre 90 y 180 días; cuando las condiciones de humedad y temperatura son óptimas, la germinación se produce con rapidez (De Miguel, 1991).

## **2.2 Problemas fitosanitarios del garbanzo**

De entre los factores que limitan la producción de este cultivo a nivel mundial, destacan las enfermedades, las cuales, 67 son ocasionadas por hongos fitopatógenos, tres por bacterias, 22 por virus y 80 por nematodos. Sin embargo, no todos causan daños de importancia económica (Haware, 1998).

En el caso particular de México, se tienen problemas fitosanitarios ocasionados por plagas, malezas y enfermedades. Para el caso de plagas son: Gusano trozador (*Agrotis ipsilon* Hufnagel y *Feltia subteterránea* Fabricius), minadores de la hoja (*Lyriomiza* sp. Blanchard), gusano soldado (*Spodoptera exigua* Hubner) y gusano bellotero (*Heliothis virescens*, Fabricius y *Heliothis zea* Boddie). Las principales malezas presentes en este cultivo son zacate Johnson (*Sorghum halepense* L.) verdolaga (*Portulaca oleraceae* L.) zacate pinto (*Echinocloa colonum* L.) quelite o quelite bleto (*Amaranthus* spp L.) y lengua de vaca (*Rumex crispus* L.), las cuales compiten con el cultivo por luz, agua y nutrimentos, siendo también alguna de ellas portadoras sintomáticas de la fusariosis vascular (Mateo, 1996 y Gómez *et al*, 1998).

## **2.3. *Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. *ciceris* (Padw.) Matuo & Sato**

### **2.3.1 Antecedentes**

Prasad y Padwick (1939) reportaron como agente causal de la marchitez del garbanzo a *Fusarium* sp., y, en 1940 Padwick lo llamó *F. orthocera* Apeen & Wollenw var. *ciceris*. Pero en 1958 Erwin lo renombró como *F. lateritium* (Nees) Snyder y Hansen f. sp.

*ciceris* (Padw) Erwin. Finalmente, Booth en 1971 lo llamó *Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. *ciceris* (Padw.) Matua & Sato como se le conoce actualmente.

### 2.3.2 Distribución

*F. oxysporum* Schlechtend es un complejo cosmopolita que habita el suelo y es responsable de la pudrición y marchitez de un gran número de plantas. Mas de 150 hospedantes específicos de formas especiales han sido descritos en el complejo *Fusarium oxysporum* (Baayen *et al.*, 2000). Por su parte Skovgaard *et al.*, (2001) mencionan que se ha descrito más de 75 formas especiales de *Fusarium oxysporum*. Los Miembros de *Fusarium oxysporum* son conocidos por las devastaciones económicas al causar marchitamiento vascular de una gran cantidad de plantas agronómicamente importantes (O'Donnell, *et al.*, 2004)

La marchitez vascular causado por *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* es un factor limitante del cultivo de garbanzo en la región Mediterránea y el subcontinente Indio (Haware, 1990; Nene y Reddy, 1987), pudiendo originar pérdidas anuales de rendimiento de 10-15% en la India (Singh y Dahiya, 1973) y España (Trapero y Jiménez, 1985), y la devastación completa del cultivo en condiciones determinadas (Halila y Strange, 1996).

### 2.3.3 Epidemiología

*F. oxysporum* inverna en el suelo en forma de micelio y en cualquiera de sus formas conidiales, pero con mayor frecuencia por clamidosporas en los restos de vegetales y puede persistir como saprofito por mas de 10 años en ausencia de hospedantes susceptibles; se encuentran también en el hilum de la semilla en forma de clamidosporas, las cuales juegan un papel muy importante en la dispersión y transmisión de la enfermedad a nuevas áreas. En semilla puede sobrevivir más de dos años. Se disemina a corta distancia mediante el salpique por el agua de riego, equipo agrícola contaminado; y a grandes distancias mediante semillas y propágulos infectados. Una vez

que el inóculo se ha establecido en el suelo es muy difícil su erradicación (Blancard *et al.*, 1991)

En plantas sanas que crecen en un suelo infestado, éstas son infectadas por las heridas causadas por implementos agrícolas de labranza o por el crecimiento de raíces secundarias; los tubos germinativos de los conidios o el micelio penetran directamente a la planta a través de los pelos radicales. El micelio invade la región vascular propagándose intercelularmente, dónde produce microconidios que son transportados en sentido ascendente hacia el tallo y corona de la planta. Produce sustancias que degradan tejidos y colapsan las células del hospedante. Provocan decoloración marrón y taponamiento de los vasos del sistema vascular, existiendo déficit hídrico, lo cual induce marchitez y posteriormente muerte de la planta (Agrios, 1996).

Este hongo daña a las células vegetales y causa enfermedad mediante la combinación de diferentes mecanismos de patogénesis, destacando la producción y liberación de enzimas y toxinas que afectan la permeabilidad de las membranas celulares e interrumpen el metabolismo celular, produciendo los síntomas característicos de la marchitez vascular (Herrera y Ulloa, 1998).

El hongo secreta toxinas como la licomarasmina y ácido fusárico que afectan a células parenquimatosas adyacentes al xilema y fijan metales pesados con  $\text{Fe}^{3+}$  y el  $\text{Cu}^{2+}$  que dificultan la permeabilidad de las membranas celulares e inhiben las reacciones enzimáticas (Cruz *et al.*, 1998)

La temperatura óptima para el desarrollo de *F. oxysporum* es alrededor de 26 °C, pero los síntomas se manifiestan a temperaturas mas altas, en periodos de baja humedad relativa y fuerte luminosidad. El hongo es favorecido por suelos con alto contenido de materia orgánica, así como aquellos en dónde existen poblaciones de nemátodos agalladores, ya que estos favorecen la penetración del hongo al causar heridas en las plantas (Blancard *et al.*, 1991).

#### 2.3.4 Clasificación taxonómica

Aunque la situación taxonómica de las especies de *Fusarium* aun no esta clara, *F. oxysporum* pertenece al grupo de los hongos imperfectos o Deuteromycetes, denominados así porque raras veces a nunca se reproducen sexualmente. Sin embargo, hay micólogos que no están de acuerdo con esta denominación, porque bajo ciertas condiciones ambientales y de nutrición se ha logrado que algunos hongos se reproduzcan sexualmente (Romero, 1993)

Debido a que el modo reproductivo de un mismo hongo puede variar en tiempo y espacio, Taylor *et al.*, (1999), mencionan que no es necesario clasificar a los hongos asexuales en un grupo separado, porque las secuencias de ácidos nucleicos permite clasificarlos con su meiospórico correspondiente.

Kendrick (2000), ubica al patógeno *F. oxysporum* Schl. f. sp. *ciceris* de la siguiente manera:

Phyllum: Dikaryomicota

Subphyllum: Ascomycotina

Clase: Ascomycetes

Orden: Hypocrales

Familia: Nectriaceae

Género: *Fusarium*

Especie: *Fusarium oxysporum*.

#### 2.3.5 Descripción del patógeno.

Las colonias de *Fusarium oxysporum* se caracterizan por ser de rápido crecimiento, con una tasa diaria cercana un centímetro en medio Papa-Dextrosa Agar (PDA) a 26 °C y pH de 6. La morfología de las colonias es muy variable y puede presentar dos tipos; una de tipo micelial caracterizada por la producción de abundante micelio aéreo, algodonoso y

de coloración variable de blanco a rosado-durazno, pero usualmente con un tinte púrpura o violeta mas intenso en la superficie del agar y pocos microconidios (Booth, 1971).

El hongo produce principalmente dos clases de estructuras propagativas; microconidios, las cuales son conidios unicelulares, sin septas, hialinas, elipsoidales a cilíndricas, rectas o curvadas; se forman sobre fialides laterales, cortas, simples o sobre conidióforos poco ramificados. Estas estructuras tienen 5-12 micras de largo por 2.5-3.5 micras de ancho. Los macroconidios presentan paredes delgadas, hialinas, fusiformes, largas, moderadamente curvadas en forma de hoz, con varias células y de tres a cinco septas transversales, con la célula basal elongada y la célula apical atenuada; las macroconidios miden de 27 a 46 micras de largo por 3.0 a 4.5 micras de ancho; además el hongo forma estructuras de conservación llamadas clamidosporas, que son esporas formadas a partir de la condensación del contenido de las hifas y de las conidias, de paredes gruesas. Estas se localizan solas o en pares, terminales o intercalares y poseen un tamaño de 5 a 15 micras de diámetro (Ahmed y Reddy, 1993 y Haware, 1998). Estructuras con las cuales este hongo sobrevive a condiciones ambientales desfavorables y en el suelo como saprofito de vida libre en ausencia de plantas hospedantes. Hasta el momento no se conoce la fase perfecta del hongo (Nelson *et al*, 1983, Romero, 1993).

### **2.3.6 Sintomatología**

La fusariosis de garbanzo presenta dos síndromes, denominados amarillamiento y marchitamiento, distinguibles entre si tanto por los síntomas que producen como por la cronología con que estos se desarrollan. Ambos síndromes son consecuencias de infecciones vasculares de la planta, y llevan asociada una coloración castaño oscura del xilema y médula de la raíz, cuello y tallo de la planta infectada.

El síndrome de amarillamiento se caracteriza por el desarrollo progresivo de clorosis, amarillez y necrosis de folíolos, que progresa de forma acrópeta en la planta dando lugar a la defoliación de esta. Generalmente, en inoculaciones artificiales las plantas mueren a

los 40 días después de la siembra en suelo infestado (Trapero, 1983; Trapero y Jiménez, 1985).

El síndrome de marchitamiento se caracteriza por un desarrollo rápido de flacidez y clorosis verde mate en las hojas, en ausencia de amarillamiento, que se extiende poco después al resto de la planta. La flacidez es seguida por la desecación de hojas y tallos, los folíolos permanecen adheridos al raquis, y posteriormente la planta muere. En inoculaciones artificiales mediante siembra en suelo infestado por el patógeno, la planta susceptible muere generalmente antes de transcurridos los 20 días después de la siembra (Trapero, 1983; Trapero y Jiménez, 1985).

Ambos síndromes han sido descritos en la literatura fitopatológica asociados con la fusariosis vascular del garbanzo, aunque el de marchitez ha sido el más común y tradicionalmente reconocido en diversos países (Nene, 1980).

*F. oxysporum* f. sp. *ciceris* es un hongo de suelo, necrótrofo obligado, patogénicamente especializado de especies de *Cicer*, a los que infecta vascularmente, y transmisible en semillas infectadas de *C. arietinum* (Haware *et al.*, 1978; Nene y Haware, 1980). No obstante, *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* puede invadir asintóticamente raíces de otras plantas, tanto leguminosas como no leguminosas, tales como: guisante (*Pisum sativum* L.), lentejas (*Lens sculenta* Moench) *Cajanus cajan* (L.) Millsp. (Haware y Nene, 1982a), altramuz blanco (*Lupinus albus* L.), habas (*Vicia faba* L.), frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), melón (*Cucumis melo* L.) papa (*Solanum tuberosum* L.) remolacha azucarera (*Beta vulgaris* L.), *Chenopodium album* L., y veza (*Vicia sativa* L.) (Trapero y Jiménez, 1985)

*F. oxysporum* f. sp. *ciceris* puede invadir plántulas de garbanzo de cultivares tanto susceptibles como resistentes durante la germinación y emergencia, en los primeros días después de la siembra, sin necesidad de heridas en los tejidos subterráneos de la planta joven. La penetración del patógeno por la planta tiene lugar principalmente a través de los cotiledones, y en las zonas del hipocótilo y epicótilo próximas a los cotiledones; y en menor proporción por zonas de la raíz principal, a excepción del ápice radical.

Posteriormente, tras el crecimiento del hongo a través del cortex radical, tiene lugar la colonización vascular de la planta debido al crecimiento de las hifas a lo largo del eje vegetal y al transporte de microconidias en los vasos del xilema, seguido de la colonización de los vasos adyacentes debido al crecimiento lateral del micelio a través de los poros laterales de aquellos. Inicialmente, la colonización vascular se produce mediante el crecimiento de hifas delgadas en la raíz y base del tallo de la plántula. Posteriormente, se desarrollan hifas gruesas irregulares y ramificadas cuyo crecimiento profuso da lugar a la oclusión del lumen del vaso infectado (Jiménez, 1994)

### **2.3.7 Especialización fisiológica de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris***

De los estudios de patogenicidad en aislados *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* realizados por varios investigadores en diferentes partes del mundo, este ha sido clasificado en dos patotipos por el síndrome que inducen en cultivares susceptibles de garbanzo. Cuando inducen el síndrome de amarillamiento son llamados patotipo de amarillez y patotipo de Marchitez cuando inducen el Síndrome de Marchitez. A su vez, los aislados pertenecientes a un patotipo pueden ser clasificados en razas patogénicas en base al patrón de reacciones que originan en un conjunto de cultivares o líneas denominados diferenciadores raciales. La primera descripción de razas patogénicas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* es debido a Haware y Nene (1982b), quienes reportaron la existencia de cuatro razas (1, 2, 3 y 4) en la India al inocular 10 cultivares de garbanzo (Annigeri, BG-212, Chaffa, C-104, CPS-1, JG-62, JG-74, K-850, L-550 y WR-315). Posteriormente, se identificaron dos razas (0 y 5) en España (Cabrera de la Colina *et al.*, 1985) y Túnez (Halila y Strange, 1996) mientras tanto otra (raza 6) fue reportada en USA (Phillips, 1988). Subsecuentemente, la raza 1 se dividió en dos razas llamadas raza 1A (de la India) y raza IB/C (de España) basado en la variación en la reacción sobre líneas diferenciales (Trapero y Jiménez, 1985; Jiménez *et al.*, 1993). La Raza 1B/C también se encontró en USA (California), Siria, Turquía, y Túnez. De esta manera tenemos un total de ocho razas del patógeno que han sido reportadas en el mundo. Recientemente se ha mencionado la presencia de la raza 0 y 6 en la India (Rahman, 1998).

La raza 1 se caracteriza por no ser patogénica sobre JG-74, CPS-1, BG-212 y WR-315; mientras que la raza 2 no es patogénica únicamente sobre WR-315; la raza 3 no es patogénica únicamente sobre JG-74 y la raza 4 es patogénica sobre JG-74 y WR-315.

Posteriormente investigadores españoles al inocular seis cultivares diferenciales (BG-212, C-104, CPS-1, JG-62, JG-74 Y WR-315) de los 10 usados por Haware y Nene (1982b) junto con las siguientes variedades: 12-071/10054, ICCV-2, ICCV-4, PV24 y P-2245, con 11 aislados de *F. oxysporum* f. sp, *ciceris* de Andalucía y con aislados representativos de las razas descritas en la India, asignaron a sus aislamientos a tres nuevas razas, denominadas 0, 5 y 6 (Cabrera de la colina *et al.*, 1986; Jiménez *et al.*, 1989a).

La raza 0 es la menos virulenta de las razas descritas y se caracteriza por no ser patogénicas sobre el cultivar desi JG-62, el cual es susceptible a todas las demás razas descritas. La raza 0 es patogénica sobre C-104 y 12071/10054. Hasta el momento, todos los aislados de la raza 0 estudiados inducen el síndrome de amarillez, que se desarrolla a los 30-40 días después de la inoculación por el método de siembra en suelo infestado contenido en macetas (Nene y Haware, 1980; Trapero y Jiménez, 1985).

La raza 5 induce el síndrome de marchitez rápida en cultivares susceptibles, y se caracteriza por no ser patogénica en la línea desi 12-071/10054, que es susceptible a la raza 0, pero patogénica en el resto de los cultivares diferenciadores inoculados excepto BG-212 y WR-315. Los cultivares CPS-1 y JG-74 son moderadamente susceptibles a la raza 5, por cuya infección desarrollan un amarillamiento foliar lento y progresivo que es distinguible de la amarillez causada por la raza 0 en cultivares susceptibles (Jiménez *et al.*, 1989a).

La raza 6, que induce una marchitez vascular similar a la originada por la raza 5 y las razas descritas en la India, se caracteriza por ser patogénica sobre C-104, ICCV-4 y JG-

62 y no patogénica sobre 12-071/10054 (que es susceptible a la raza 1), BG-212, CPS-1 y JG-74 (Jiménez *et al.*, 1989a).

De un estudio de pruebas de patogenicidad realizado por investigadores españoles con una amplia muestra de aislados de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, incluyendo los de Andalucía, Extremadura, y Castilla y León en España, California, Marruecos y Túnez, los resultados confirmaron que los aislados del hongo pueden ser clasificados ya sea en los patotipos de Amarillez o Marchitez de acuerdo con el síndrome que causan en cultivares susceptibles de garbanzo. Además indicaron que ambos patotipos existen en el sur y noroeste de España, así como en California y posteriormente Marruecos (Jiménez *et al.*, 1993). Pero no así para los aislados procedentes de Túnez, los cuales se ubicaron en el patotipo de Amarillez, característica que ha sido recientemente confirmada por Halila y Strange (1996). Además en dichos estudios los aislados procedentes de California caracterizados patogénicamente como raza 1, indujeron el síndrome de amarillez (Raza 1B/C), en contraposición con el resto de aislados de raza procedentes de California, España, India y Marruecos, los cuales inducen el síndrome de Marchitez (Raza 1A) (Jiménez *et al.*, 1993).

En consecuencia, se tiene que los aislados pertenecientes a la raza 0, 1B/C inducen el síndrome de Amarillez descrito anteriormente, mientras que aislados pertenecientes a la raza 1, 2, 3, 4, 5 y 6 causan el síndrome de Marchitez. Además, la información mas reciente indica que la raza 0, 1 (1A y 1BC), 5 y 6 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* existen en España y California, mientras que las razas 0 y 1B/C existen en Siria, Túnez y Turquía; las razas 0, 1A y 6 en Israel; las razas 1A y 6 en Marruecos, y la raza 0 en el Líbano (Halila y Strange, 1996; Jiménez *et al.*, 1993).

### 2.3.8 Identificación de razas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* mediante pruebas de patogenicidad

La identificación de razas patogénicas en hongos fitopatógenos se ha llevado a cabo por el fenotipo de las interacciones planta-patógeno, en pruebas de patogenicidad basadas en la inoculación de líneas diferenciales de la planta huésped con aislados del patógeno. Por lo que la correcta identificación de las variantes patogénicas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* presentes en una determinada zona de cultivo, es un aspecto crucial con vistas a la utilización y desarrollo mediante mejora genética de cultivares con resistencia estable.

A las líneas diferenciadoras también se le conoce como plantas diferenciales, las cuales corresponden al conjunto de plantas que al inocularse, manifiestan una reacción específica que permite distinguir las razas fisiológicas diferentes de un patógeno, especie o raza del mismo y, son utilizadas a nivel mundial. Una raza fisiológica se basa en el principio de la existencia de la variabilidad entre organismos y se define como grupo de individuos morfológicamente idénticos, pero que se caracterizan por atacar en diferente grado de virulencia a individuos de la misma especie (Robinson, 1989; Maclean *et al.*, 1993; Agrios, 1996).

Para la identificación de razas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, se emplean diferentes conjuntos de líneas diferenciales. El número de líneas diferenciales en los conjuntos no son menos de 8 pero tampoco más de 22 (Haware y Nene, 1982b; Jiménez *et al.*, 1989a). Para fines prácticos se presenta una lista resumen (Cuadro 17) de las líneas diferenciales que utilizó Haware y Nene (1982b), investigadores a quienes debemos la primera identificación de las razas de estos patógenos empleando esta metodología; así como las líneas utilizadas por investigadores del Instituto de Agricultura Sostenible de la Universidad de Córdoba, y las condiciones con que se trabajan los aislamientos para la inoculación

Cuadro 17 Reacción de las líneas de garbanzo diferenciales a la inoculación con las distintas razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*

| Líneas diferenciales | Razas |    |      |   |   |   |    |    |
|----------------------|-------|----|------|---|---|---|----|----|
|                      | 0     | 1A | 1B/C | 2 | 3 | 4 | 5  | 6  |
| 12-071/10054         | S     | M  | S    | R | R | R | R  | M  |
| JG-62                | R     | S  | S    | S | S | S | S  | S  |
| C-104                | M     | M  | R/M  | S | S | S | S  | M  |
| JG-74                | R     | R  | R    | S | R | R | M  | R  |
| CPS-1                | R     | R  | R    | S | M | M | M  | R  |
| BG-212               | R     | R  | R    | S | M | M | R  | R  |
| WR-315               | R     | R  | R    | R | S | R | R  | R  |
| Annigeri             | --    | S* |      | S | S | S | -- | -- |
| Chaffa               | --    | S* |      | S | S | S | -- | -- |
| L-550                | --    | S* |      | S | S | S | -- | -- |
| 850-3/27             | --    | M* |      | M | M | M | -- | -- |
| ICCV-2               | R     | R  | R    | S | S | S | S  | M  |
| ICCV-4               | R     | R  | R    | S | S | S | S  | M  |
| P-2245               | S     | S  | S    | S | S | S | S  | S  |

Para evaluar la severidad de los daños, se considera una escala de severidad de 0-4 y según el porcentaje de tejido foliar afectado (0=0%, 1=1-33%, 2=34-66, 3=67-100, 4= planta muerta) a los 40 días de la siembra en una mezcla de suelo infestado con AMA colonizado por el hongo. Las reacciones con severidad media <1 y >3 se consideran resistentes (R) y susceptibles (S), respectivamente. Las reacciones de severidad intermedia entre dichos valores se consideran moderadamente susceptibles (M) (Haware y Nene, 1982b; Jiménez Díaz et al., 1989b). \* Inicialmente para la raza 1, la cual ha sido reclasificada por el patrón de síntomas en investigaciones recientes.

Para la realización de las pruebas de patogenicidad, la inoculación de las líneas diferenciadoras de garbanzo se lleva a cabo mediante la siembra de semillas germinadas en suelo infestado artificialmente contenido en macetas. Con este propósito, los aislados de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* no deben ser mantenidos repetidamente en medios de crecimiento sintéticos debido a mutaciones que ocurren con frecuencia y que están asociadas con pérdida de virulencia. Por ello, los aislados son conservados en suelo estéril. El inóculo se incrementa en una mezcla de arena y harina de maíz (AMA) (9:1, p/p) durante 15 días a 25 °C. Posteriormente el AMA infestado se mezcla con suelo esterilizado en una proporción de 1:12 (p/p). Una vez que el hongo está establecido en esta mezcla de suelo infestado, se siembran las semillas pregerminadas de garbanzo en macetas que contienen dicha mezcla. Este nivel de inóculo es suficiente para causar el 100% de mortalidad en 'JG-62', una línea de garbanzo altamente susceptible. La reacción de la planta a la infección se determina mediante la severidad de los síntomas

en una escala de 1 a 4 (1=no síntomas; 4=planta muerta). según el porcentaje de área foliar afectada a los 20 y 40 días después de la inoculación.

### **2.3.9 Control de la Fusariosis Vascular del garbanzo mediante cultivares resistentes**

Al parecer el método más efectivo de contrarrestar los daños de este patógeno es el empleo de variedades resistentes, pues se ha demostrado que la rotación de cultivos es ineficiente debido a la capacidad del patógeno de sobrevivir prolongadamente en el suelo mediante clamidosporas, así como de infectar asintóticamente otros cultivos de plantas leguminosas y no leguminosas (Cabrera de la Colina, 1986; Traperó y Jiménez, 1985). De forma similar, investigaciones sobre la utilización combinada de tratamientos fungicidas de la semilla de cultivares de garbanzo de diferente susceptibilidad, indicaron que algunos fungicidas incrementan significativamente la emergencia de las plántulas y retrasan el comienzo de las epidemias en cultivares moderadamente resistentes, pero no en cultivares altamente susceptibles. Sin embargo, ningún tratamiento fungicida proporcionó un nivel de control satisfactorio de la enfermedad (Jiménez y Traperó, 1985).

De las líneas que se usan como plantas diferenciales se han rastreado genes asociadas a la resistencia a este patógeno. Investigaciones más cuidadosas mostraron que la resistencia a la raza 1 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en los cvs. CPS-1 y WR-315 es conferida por un único alelo recesivo, que se encuentra en el mismo *locus* en ambos genotipos de garbanzo. A su vez Kumar y Haware (1982) sugirieron que en la resistencia a la raza 1A del patógeno pudieran estar implicados otros genes mayores o complejos poligénicos, ya que los cruzamientos realizados entre líneas susceptibles y resistentes de garbanzo no mostraban la relación fenotípica esperada de 3 (susceptible): 1 (resistente).

Estudios de las segregaciones de cruzamientos entre los cvs. JG-62 y C-104 y las líneas completamente resistentes BG-212, CPS-1, P-436-2 y WR-315, así como de cruzamientos entre cultivares que mostraban marchitez tardía. 'C-104', 'K-850 3/27' y 'H-208', indicaron que la resistencia a la raza 1A de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* parece ser controlada por al menos tres *loci* independientes, designados H1, H2 y H3 (Singh *et al.*, 1987 b).

---

Investigaciones posteriores por el mismo grupo de trabajo indicaron que la resistencia a la raza 2 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* es regulada por un sistema genético similar al descrito para la raza 1A. El estudio incluyó las segregaciones F2 y F3 del cruzamiento 'P-165' (resistente) x 'C-104' (susceptible) y las líneas CPS-1 y K-850, controles, respectivamente de marchitez temprana y tardía (Gumber *et al.*, 1995). Los resultados mostraron que la resistencia a la raza 2 del patógeno es regulada por dos genes, uno de los cuales, *A*, debe estar en homocigosis recesiva y el otro, *B*, en homocigosis dominante o heterocigosis. Así, la reacción de marchitez temprana ocurre en genotipos *bb*, independientemente de *A*; y la de marchitez tardía ocurre en genotipos *AB*. Estos resultados tienen importantes implicaciones con respecto a la mejora del garbanzo en cuanto a la resistencia a las razas 1A y 2 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, ya que puede obtenerse resistencia completa al patógeno mediante cruzamientos utilizando sólo parentales con resistencia del tipo de marchitez tardía.

En el ICRISAT (International Crop Research Institute for the Semiarid Tropics) hay disponibles más de 150 líneas tanto del tipo 'desi' como del tipo 'kabuli', resistentes a la fusariosis vascular (Haware *et al.*, 1989), así como otras fuentes de resistencia a la fusariosis vascular y a la podredumbre de raíz (Reddy *et al.*, 1990). Dicha resistencia a la fusariosis vascular ha sido incorporada con éxito a cultivares de garbanzo 'desi' y 'kabuli' de alto rendimiento, incluyendo 'ICCV-2', 'ICCV-3', 'ICCV-4' e 'ICCV-5' (Kumar *et al.*, 1985), e 'ICCV-6' (Ghanekar *et al.*, 1990) procedentes de ICRISAT; 'Surutato 77', 'Sonora 80', 'Gavilan', 'Kino' y 'Tubutama' de México (Morales, 1986);

'UC-15' y 'UC-27' de California (Buddenhagen *et al.*, 1988; Helms *et al.*, 1992) y 'Andoum 1' (Halila y Harrabi, 1990) de Túnez.

#### **2.4 Herramientas disponibles en la identificación y diagnóstico de hongos fitopatógenos**

Debido a que los patógenos evolucionan constantemente a los cambios en los ecosistemas agrícolas, las estrategias de control deben de concentrarse más en las poblaciones que en los individuos si lo que se busca es efectividad. Para alcanzar esto último son necesarios los estudios de coevolución de los patógenos y sus hospedantes en los ecosistemas agrícolas, inicialmente el mas común usado para caracterizar las poblaciones de patógenos es la detección del espectro de virulencia frente a enfermedades fungosas y se diferenciaban los aislamientos en razas de acuerdo con los síntomas que causan las variedades diferenciadoras. Sin embargo este ensayo es laborioso y subjetivo, pues existe una alta influencia de la edad y las condiciones del hospedante, calidad del inóculo y de las variaciones ambientales durante el ensayo, además de que los aislamientos pueden causar respuestas intermedias. Aun así, existen varios ejemplos de análisis de diversidad genética y estructura de población de hongos fitopatógenos sobre la base a ensayos de virulencia, algunos son: *Rhynchosporium secalis*, *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*, *Bremia lactucae*, *Colletotrichum lindemathianum*, *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, *Pyricularia grisea*. Pero estos estudios combinados con los métodos moleculares hoy constituyen una herramienta complementaria en la caracterización de hongos fitopatógenos (Pérez, 2000). A continuación se mencionan brevemente los métodos usados en la caracterización de los organismos.

#### **2.4.1 Marcadores**

La estimación de la variabilidad de una población se puede realizar mediante el análisis de diferentes tipos de marcadores, los cuales han sido muy útiles en estudios de taxonomía, migración y filogenia de fitopatógenos. Un marcador es cualquier característica morfológica, molécula de proteína, enzima, ARN o DNA que permite establecer diferencias entre los organismos o grupo de organismos que se comparan (Valadez y Kahl, 2000). Nos permiten estudiar el origen y la evolución de razas dentro de una población facilitando la identificación de genes de interés y la construcción de mapas genéticos.

#### **2.4.2 Marcadores morfológicos**

Estos son utilizados en estudios de diversidad genética de especies cultivadas, permitiendo analizar aspectos cuantitativos de interés agronómico y proveer información útil en el mejoramiento genético de las plantas, ya que son caracteres fáciles de detectar (por ejemplo genes que causan deficiencia en la clorofila o enanismo en las plantas). En el caso de los microorganismos, los marcadores morfológicos pueden ser utilizados para diferenciarlos en cuanto a forma y color de la colonia, tipo de micelio, susceptibilidad a fagos o antibióticos, requerimientos nutricionales entre otros. La desventaja en la utilización de estos marcadores es que la mayoría son afectados por condiciones ambientales que pueden enmascarar los efectos del gen o genes de interés (Aguilar, 2003)

### 2.4.3 Marcadores genéticos

Nos permiten realizar un análisis directo de las traslocaciones, inversiones, inserciones o deleciones en regiones internas del DNA, en secuencias discretas y específicas. Para obtener marcadores de DNA se usan diferentes métodos que pueden agruparse de manera convencional en tres categorías. La primera técnica conocida como hibridación tipo Southern, tiene el propósito de explorar las variaciones en la longitud de los fragmentos de DNA, ocasionados por la restricción del genoma con algunas endonucleasas en particular. La segunda categoría agrupa las metodologías basadas en la tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (Polimerasa Chain Reaction, por sus siglas en inglés), la cual utiliza secuencias de oligonucleótidos que inician la síntesis in Vitro de fragmentos de DNA de longitudes variables no mayores de 6 kb en promedio. Para esta tecnología se pueden citar como ejemplos las metodologías que generan los RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AP-PCR (Arbitrarily Primed PCR), DAF (DNA Amplification Fingerprinting) y AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). Las abreviaciones de los nombres de las técnicas corresponden a sus siglas en inglés. La tercera categoría involucra metodologías que combinan los productos de PCR con la hibridación tipo Southern (Valadez y Kahl, 2000).

Estos marcadores se han utilizado en la identificación de patógenos como *Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc. y *F. culmorum* (W.G.Sm) Sacc. (Kelly et al., 1988) *Rhizoctonia solani* Kühn, *Colletotrichum lindemathianum* (Sacc. & Magnus) Lams-Scrib. (González y Simpson, 1997).

Las ventajas de estos marcadores es que son reproducibles en cualquier etapa del desarrollo de un organismo, son independientes del fenotipo, el número de polimorfismos que se pueden detectar es casi ilimitado y existe una gran variedad de técnicas disponibles que son muy versátiles, ya que permiten detectar huellas genómicas,

identificar o etiquetar genes. hacer mapas genéticos y lógicamente diagnosticar enfermedades (Valadez et al., 2001). Presentan ventajas especiales en microorganismos difíciles de cultivar, difíciles de identificar después de ser cultivados o presentes en cantidades escasas.

#### 2.4.4 Comparación de secuencias de genes altamente conservados

El conocimiento detallado de la variación genética, origen evolutivo y la relación entre formas especiales dentro del complejo de *Fusarium oxysporum* proporciona una poderosa herramienta para el desarrollo de estrategias y programas de control más efectivos en las plantas afectadas por este grupo de patógenos; especialmente, si coexisten más de una *formae specialis* de tipo monofilético. Para el estudio evolutivo entre especies cercanamente emparentadas, y a menudo especies de hongos desconocidos (crípticos), se seleccionan genes cuyas secuencias de DNA sean altamente conservadas y que incluyan al menos un intrón (Skovgaard et al., 2001). Entre los genes más utilizados están el factor de elongación y traducción  $1\alpha$  (*EF1 $\alpha$* ),  $\beta$ -tubulina ( *$\beta$ -tub*), la calmodulina (*Cal*), actina (*Act*), histona 3 (*H3*) (Geiser et al., 2004), nitrato reductasa (NIR) fosfato permeasa (PHO) y subunidades pequeñas de DNA<sub>r</sub> de las mitocondrias (mtSSA). Este acercamiento filogenético basado en la concordancia de genealogías de genes múltiples es una efectiva herramienta para reconstruir la historia evolutiva de los hongos patogénicos (Skovgaard et al., 2001). Entre los hongos que se conoce su genealogía génica empleando datos de secuencias discretas de DNA se encuentran *F. oxysporum* f. spp. *cubense*, *melonis*, *vasinfectum* (Skovgaard, et al., 2001), *asparagi*, *dianthi*, *gladioli* y *lini* (Baayen et al., 2000), los cuales tienen un origen polifilético; en tanto que *F. oxysporum* formas especiales *ciceris*, (Jiménez et al., 2004), *lilii*, *tulipae* y *spinaciae* (Bayee et al., 2001) presentan un origen monofilético

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Fase de laboratorio**

Todas las actividades relacionadas al presente trabajo de investigación fueron desarrolladas en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Fitotecnia y en el Invernadero del Departamento de parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo.

##### **3.1.1 Colecta de plantas de garbanzo enfermas en Sinaloa**

El estado de Sinaloa se ubica al noroeste de la República Mexicana con las siguientes coordenadas geográficas extremas al norte 27° 02', al sur 22° 29' de latitud norte; al este 105° 23', al oeste 109° 28' de longitud oeste (INEGI, 2000). Las poblaciones están ubicadas a diversas altitudes sobre el nivel del mar que van desde los 10, hasta los 380 msnm que son Los Mochis y Cosalá, respectivamente. El estado de Sinaloa está compuesto por 18 municipios a saber: Ahome, El Fuerte, Choix, Angostura, Badiraguato, Cosalá, Guasave, Mocorito, Salvador Alvarado, San Ignacio, Sinaloa, Navolato, Culiacán, Elota, Mazatlán, Rosario, Concordia y Escuinapa. En el estado se ubicaron 16 puntos de muestro (Cuadro 18), los cuales correspondieron a los campos de Investigación del INIFAP (7 sitios de muestreo), Valle de Culiacán, Mocorito, Salvador Alvarado, Angostura, Sinaloa de Leyva. En total se colectaron 34 plantas que presentaron marchitez.

Cuadro 18. Localidades muestreadas en el estado de Sinaloa.

| Municipio            | Localidad                                                                         | SITIO                        | No.<br>PLANTAS |
|----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|----------------|
| Culiacán             | INIFAP                                                                            | 1. Lote con rabia            | 6              |
| Culiacán             | INIFAP                                                                            | 2. Lote evaluación           | 1              |
| Culiacán             | INIFAP                                                                            | 3. Lote evaluación           | 1              |
| Culiacán             | INIFAP                                                                            | 4. Lote evaluación           | 1              |
| Culiacán             | INIFAP                                                                            | 5. Lote evaluación           | 1              |
| Culiacán             | INIFAP                                                                            | 6. Lote evaluación           | 2              |
| Culiacán             | INIFAP                                                                            | 7. Anexo a un lote con rabia | 3              |
| Angostura            | Ejido Melchor Ocampo                                                              | 8                            | 3              |
| Salvador<br>Alvarado | Ejido Las Brisas                                                                  | 9                            | 3              |
| Mocorito             | Ejido Zapotillo                                                                   | 10                           | 1              |
| Sinaloa              | Ejido Palos Blanco                                                                | 11                           | 1              |
| Culiacán             | Estación Rosales                                                                  | 12                           | 3              |
| Angostura            | Predio El Triste                                                                  | 13                           | 2              |
| Culiacán             | Km. 10                                                                            | 14                           | 2              |
| Culiacán             | Carretera 12; 100 m después de Carretera<br>Culiacán el Dorado. Valle de Culiacán | 15                           | 2              |
| Culiacán             | Costa Rica; 2 Km. después de Carretera<br>Culiacán El Dorado. Valle de Culiacán.  | 16                           | 2              |
| <b>TOTAL</b>         |                                                                                   |                              | <b>34</b>      |

### 3.1.2 Aislamiento de *Fusarium oxysporum* de plantas de garbanzo.

Las plantas colectadas en Sinaloa fueron conservadas en refrigeración a 4 °C mientras se procesaban para el aislamiento de patógenos involucrados en la enfermedad. Para el aislamiento de *Fusarium oxysporum*, las plantas se lavaron y se les retiró la epidermis del tallo para reducir el riesgo de contaminante saprofito, posteriormente se realizó un corte longitudinal del mismo partiendo del cuello hacia arriba, y a partir de donde finalizaba el tejido dañado se realizaron cortes de tejido vegetal de aproximadamente 5 mm<sup>2</sup>, con una mitad de tejido dañado y una mitad sano. Los cortes fueron sumergidos en una solución desinfectante al 1.5 % de hipoclorito de sodio libre por 1.5 minutos, posteriormente se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril para eliminar el exceso de cloro. Luego fueron colocados sobre toallas de papel sanitas estériles para su secado. Después fueron sembrados en cajas Petri con medio de cultivo PDA bajo en

carbohidratos, ya que se ha reportado que esta condición reduce la pérdida de patogenicidad (Nelson *et al.*, 1983). Las cajas Petri fueron incubadas a  $25\pm 2$  °C y observadas a intervalos de 12 horas. De las cajas que presentaron crecimiento se hicieron cortes de PDA con micelio que fueron transferidos inmediatamente a cajas Petri individuales con medio PDA nuevo, donde se les dejó crecer por cinco días. Trascurrido este tiempo, con la ayuda de un microscopio estereoscópico, navaja de afeitar y agujas de disección, se realizó el corte de una sola hifa, la cual fue transferida a cajas Petri con PDA e incubadas a  $25\pm 2$  °C; 12 horas después, se observaron al microscopio y se procedió nuevamente a realizar el corte de una sola hifa que se transfirió nuevamente a cajas Petri con medio de cultivo PDA. Esto se realizó con la finalidad de asegurar la pureza de las colonias obtenidas. Después de que la caja Petri se saturó de micelio, se realizaron cortes de PDA y se conservaron en tubos Eppendorf de 2 mL con agua destilada estéril.

Para el medio de cultivo PDA o PDA bajo en carbohidratos; en todas las veces se empleó para un litro de agua destilada estéril 29.25 g de infusión de PDA Bioxon<sup>®</sup> más 6.75 g de agar, el cual, se esterilizó a 20 lb in<sup>2</sup> de presión por 20 min y después de enfriarse se vertió a las cajas Petri.

### **3.1.3 Obtención de cultivos monoconidiales**

Para la obtención de colonias a partir de un solo macroconidio se preparó un medio de cultivo a base de suelo agar (Klots *et al.*, 1998). Para ello el suelo primeramente fue tamizado para asegurarse que fuese homogéneo, se esterilizó cuatro veces a 20 lb in<sup>2</sup> por 20 minutos. ). Parea su preparación se emplearon 250g de suelo al cual se le agregaron 15 g de agar por litro de agua destilada, se agitó constantemente hasta lograr una mezcla uniforme y se esterilizó en una autoclave a 20 lb in<sup>2</sup> presión por 20 minutos. En las cajas Petri con medio de cultivo agar-suelo se sembraron cuadrillos de PDA de 5 mm<sup>2</sup> aproximadamente con micelio obtenidos de una sola hifa. Las cajas Petri fueron colocados bajo condiciones de luz natural por un periodo de 15 días, transcurrido ese

tiempo, con una aguja de disección se tomó micelio y se colocó sobre un portaobjetos para observar la presencia de macroconidios en un microscopio compuesto. A las cajas Petri en que se observaron formación de macroconidios se les agregaron 10 mL de agua destilada estéril y con la ayuda de una aguja de disección se hizo un ligero raspado sobre la superficie de PDA procurando no romper el medio de cultivo. La dilución compuesta de macro y microconidios se recuperaron en un tubo de ensayo a partir del cual se tomaron porciones de 10  $\mu$ L y se les agregó a otro tubo conteniendo 8 mL de agua destilada estéril. Esto se hizo solo una vez o hasta que en el campo visual de 10X de un microscopio compuesto se contabilizaron de 1 a 3 conidios. De esta dilución se tomaron 100  $\mu$ L con una micropipeta y se vertieron a las cajas Petri conteniendo medio de cultivo PDA, al cual se le agregaron otros 900  $\mu$ L de agua destilada estéril. Las cajas Petri se movieron de manera circular procurando una distribución homogénea de la dilución sobre el medio del cultivo y el excedente de líquido se desechó. Después las cajas Petri se incubaron a  $25 \pm 2$  °C y se realizaron observaciones por periodos de 12 horas, y en cuanto aparecieron pequeños puntos, se colocaron las cajas Petri al microscopio compuesto en un campo visual de 10X, y se localizaron aquellos puntos de crecimiento que fueran originados por un solo conidio. Los puntos de crecimiento se delimitaron ajustando el diafragma para que la fuente de luz incidiera únicamente sobre el punto de interés, al cual, con la ayuda de una navaja de afeitar se cuadrículó y extrajo con una aguja de disección y fue sembrado en cajas Petri con medio de cultivo PDA. Las cajas se incubaron a  $28 \pm 2$  °C por 5 días para asegurar un buen crecimiento de micelio. De estas cajas Petri se cortaron cuadros de 5 mm de PDA con micelio, los cuales se conservaron en tubos Eppendorf de 2 mL con agua destilada estéril y, se usaron para incrementar micelio y extraer DNA.

#### **3.1.4 Aislamientos procedentes de Guanajuato y Michoacán**

De la colección existente en el laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Fitotecnia de la UACH, se utilizaron 79 aislamientos monospóricos (Cuadro 19) de

*Fusarium oxysporum* aislados de plantas de garbanzo con síntomas de amarillamiento y marchitez, procedentes de los estados de Guanajuato (ubicado en las coordenadas geográficas extremas al norte 21° 52', al sur 19° 55' de latitud al este 99° 41', al oeste 102° 09' de longitud oeste) y Michoacán (ubicado en las coordenadas geográficas extremas Al norte 20°24', al sur 17°55' de latitud norte; al este 100°04', al oeste 103°44' de longitud oeste) a una altura de 2000 msnm y 1920 msnm respectivamente (INEGI, 2000). Estos aislamientos que fueron previamente caracterizados por Cámara (2001) y Luna (2002) y preservados en cuadros de 5 mm de PDA en agua destilada; se reactivaron en medio de cultivo PDA a 25±2 °C con la finalidad de detectar la presencia de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*. Cuando el micelio cubrió completamente el medio de cultivo (siete días en promedio) fueron retirados de la incubadora y procesados para la extracción de DNA por el método de Bainbridge *et al.* (1990) con sus modificaciones realizadas en el laboratorio de Biología Molecular.

Cuadro 19 Relación de aislamientos de las diferentes localidades de los estados de Guanajuato y Michoacán conservados en el Laboratorio de Biología Molecular.

| C. M. | CLAVE | ESTADO    | LUGAR DE ORIGEN                | SINTOMA                    |
|-------|-------|-----------|--------------------------------|----------------------------|
| 1     | MC1   | Michoacán | El calvario                    | Amarillamiento             |
| 2     | MC2   | Michoacán | El calvario                    | Amarillamiento             |
| 3     | MC3   | Michoacán | El calvario                    | Amarillamiento             |
| 4     | MC4   | Michoacán | El calvario                    | Amarillamiento             |
| 5     | MC5   | Michoacán | El calvario                    | Amarillamiento             |
| 6     | MS6   | Michoacán | Singuio                        | Amarillamiento             |
| 7     | MS7   | Michoacán | Singuio                        | Amarillamiento             |
| 8     | MS8   | Michoacán | Singuio                        | Amarillamiento             |
| 9     | MS9   | Michoacán | Singuio                        | Amarillamiento             |
| 10    | MS10  | Michoacán | Singuio                        | Amarillamiento             |
| 12    | MP12  | Michoacán | La purísima                    | Amarillamiento             |
| 13    | MP13  | Michoacán | La purísima                    | Amarillamiento             |
| 14    | MP14  | Michoacán | La purísima                    | Amarillamiento             |
| 15    | MP15  | Michoacán | La purísima                    | Amarillamiento             |
| 16    | MP16  | Michoacán | La purísima                    | Amarillamiento             |
| 17    | MI17  | Michoacán | El calvario (frente a (INIFAP) | Amarillamiento             |
| 19    | MI19  | Michoacán | El calvario (frente a (INIFAP) | Marchitez                  |
| 21    | MM21  | Michoacán | Morelia                        | Marchitez                  |
| 22    | MM22  | Michoacán | Morelia                        | Marchitez                  |
| 23    | MM23  | Michoacán | Morelia                        | Marchitez                  |
| 24    | MM24  | Michoacán | Morelia                        | Marchitez                  |
| 25    | MM25  | Michoacán | Morelia                        | Amarillamiento             |
| 26    | MM26  | Michoacán | Morelia                        | Amarillamiento y Marchitez |

| C. M. | CLAVE | ESTADO     | LUGAR DE ORIGEN    | SINTOMA                    |
|-------|-------|------------|--------------------|----------------------------|
| 27    | MM27  | Michoacán  | Morelia            | Amarillamiento y Marchitez |
| 28    | MM28  | Michoacán  | Morelia            | Amarillamiento             |
| 29    | MM29  | Michoacán  | Morelia            | Marchitez                  |
| 30    | MM30  | Michoacán  | Morelia            | Amarillamiento             |
| 31    | MM31  | Michoacán  | Morelia            | Amarillamiento y Marchitez |
| 32    | MM32  | Michoacán  | Morelia            | Marchitez                  |
| 33    | MM33  | Michoacán  | Morelia            | Marchitez                  |
| 34    | MM34  | Michoacán  | Morelia            | Marchitez                  |
| 35    | MCu35 | Michoacán  | Cuitzeo            | Amarillamiento             |
| 36    | MCu36 | Michoacán  | Cuitzeo            | Amarillamiento             |
| 37    | MCu37 | Michoacán  | Cuitzeo            | Marchitez                  |
| 38    | MCu38 | Michoacán  | Cuitzeo            | Amarillamiento             |
| 40    | GP40  | Guanajuato | Puquichapio        | Marchitez                  |
| 41    | GP41  | Guanajuato | Puquichapio        | Amarillamiento             |
| 42    | GP42  | Guanajuato | Puquichapio        | Amarillamiento             |
| 43    | GP43  | Guanajuato | Puquichapio        | Amarillamiento             |
| 44    | GVS44 | Guanajuato | Valle de Santiago  | Amarillamiento             |
| 45    | GVS45 | Guanajuato | Valle de Santiago  | Marchitez                  |
| 47    | GVS47 | Guanajuato | Valle de Santiago  | Amarillamiento             |
| 48    | GVS48 | Guanajuato | Valle de Santiago  | Marchitez                  |
| 50    | GYr50 | Guanajuato | Yuriria            | Marchitez                  |
| 51    | GYr51 | Guanajuato | Yuriria            | Marchitez                  |
| 52    | GYr52 | Guanajuato | Yuriria            | Marchitez                  |
| 53    | GYr53 | Guanajuato | Yuriria            | Marchitez                  |
| 54    | GYr54 | Guanajuato | Yuriria            | Marchitez                  |
| 55    | GYr55 | Guanajuato | Yuriria            | Marchitez                  |
| 56    | GYr56 | Guanajuato | Yuriria            | Marchitez                  |
| 57    | GYr57 | Guanajuato | Yuriria            | Marchitez                  |
| 58    | GSa58 | Guanajuato | Salvatierra        | Marchitez                  |
| 59    | GSa59 | Guanajuato | Salvatierra        | Marchitez                  |
| 60    | GSa60 | Guanajuato | Salvatierra        | Marchitez                  |
| 61    | GSa61 | Guanajuato | Salvatierra        | Marchitez                  |
| 62    | GSa62 | Guanajuato | Salvatierra        | Marchitez                  |
| 63    | GSa63 | Guanajuato | Salvatierra        | Marchitez                  |
| 64    | GSa64 | Guanajuato | Salvatierra        | Marchitez                  |
| 65    | GSa65 | Guanajuato | Salvatierra        | Asintomático               |
| 66    | GCl66 | Guanajuato | Celaya 3           | Asintomático               |
| 67    | GCl67 | Guanajuato | Celaya I           | Marchitez                  |
| 68    | GCl68 | Guanajuato | Celaya             | Marchitez                  |
| 69    | GJP69 | Guanajuato | Jaral del Progreso | Marchitez                  |
| 70    | Glp70 | Guanajuato | Irapuato           | Marchitez                  |
| 71    | Glp71 | Guanajuato | Irapuato           | Marchitez                  |
| 72    | Glp72 | Guanajuato | Irapuato           | Marchitez                  |
| 73    | GJR73 | Guanajuato | Juventino Rosas    | Marchitez                  |
| 74    | GVg74 | Guanajuato | Villagrán          | Marchitez                  |
| 75    | GAG75 | Guanajuato | Apaseo el grande   | Marchitez                  |
| 76    | GCz76 | Guanajuato | Cortazar           | Marchitez                  |
| 77    | GYr77 | Guanajuato | Yuriria            | Marchitez                  |
| IB.8  | GCl   | Guanajuato | Celaya             | Marchitez                  |
| 1.2   | GAg   | Guanajuato | Apaseo el grande   | Marchitez                  |
| 10.4  | Glp   | Guanajuato | Irapuato           | Marchitez                  |
| 10.5  | Glp   | Guanajuato | Irapuato           | Marchitez                  |
| 10.9  | Glp   | Guanajuato | Irapuato           | Marchitez                  |

| C. M. | CLAVE | ESTADO     | LUGAR DE ORIGEN | SINTOMA   |
|-------|-------|------------|-----------------|-----------|
| V.7   | G     | Guanajuato |                 | Marchitez |
| 4A    | G     | Guanajuato |                 | Marchitez |
| 4A.6  | G     | Guanajuato |                 | Marchitez |

M. C: Cultivo Monospórico y numero consecutivo de identificación

### 3.1.5 Extracción de DNA geonómico

El DNA se extrajo empleando el método propuesto por Bainbridge *et al.* (1990) con algunas modificaciones. Con la ayuda de una espátula se colectó la mayor cantidad posible de micelio y se transfirió a un mortero donde fue macerado con nitrógeno líquido, se transfirió a tubos Eppendorf de 2 mL, al cual se le agregaron 600  $\mu$ L de solución de lisis (10 mM Tris base-HCL pH 8; 250 mM EDTA 2H<sub>2</sub>O pH 8; proteinasa K (Sigma ) 200  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>; triton-X100, 0.5%) y se incubaron en baño maría por una hora a 75 °C en agitación constante.

Se retiraron del baño maría y se agregó a cada tubo: 0.15 vol de NaCl al 1.5 M, 0.7 vol de fenol equilibrado a 4 °C, 0.3 vol de cloroformo a 4 °C, se mezclaron por inversión. Después se centrifugaron a 13,200 rpm en una centrifuga Eppendorf a 4 °C por 20 min. El sobrenadante formado se transfirió a un tubo nuevo cuidando de no romper la interfase. Se le agregaron 8  $\mu$ L de RNasa y se incubaron a 37 °C por una hora, transcurrido ese tiempo se le adicionó un volumen de cloroformo, se mezclaron por inversión y se centrifugaron a 13,200 rpm por 10 min. La fase superior se transfirió a un tubo nuevo al cual se le agregó 0.54 vol de isopropanol a 4 °C del volumen recuperado y se dejó reposar hasta el día siguiente a -20 °C para que se precipitara el DNA.

Después de 12 horas a -20 °C, los tubos con DNA precipitado se centrifugaron a 13,200 rpm por 40 min. Se decantó cuidadosamente el sobrenadante para no perder la pastilla formada. La pastilla se lavó con 1.5 mL de etanol al 70% y los tubos se centrifugaron

por cinco min a 13, 200 rpm; esta actividad se repitió por otras dos veces para aquellas pastillas que presentaron residuos mucilaginosos. Los tubos permanecieron invertidos al menos 30 min hasta que las pastillas se secaron. Posteriormente a cada tubo se le adicionó 100  $\mu\text{L}$  de TE pH 8.0 (10 mM Tris-HCl pH 7.6, 1 mM EDTA pH 8.0) para disolver el DNA.

### **3.1.6 Cuantificación de DNA**

Para determinar la concentración de DNA de cada muestra procesada, se hizo una dilución de 1:40; para la cual se tomó tres  $\mu\text{L}$  del stock de DNA y se diluyó en 117  $\mu\text{L}$  de agua destilada estéril sumando un volumen total de 120  $\mu\text{L}$  que se colocó en la celda. La lectura se realizó en un espectrofotómetro Perkin Elmer UV/VIS Lambda Bio™, a una longitud de 260 nm.

La concentración se calculó con base en la absorbancia proporcionada en  $\mu\text{g mL}^{-1}$  multiplicándolo por el factor de dilución (40). Los resultados obtenidos fueron imprescindibles ya que a partir del stock se realizaron diluciones a 20 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  de DNA; concentración final (dilución) de DNA con la cual se trabajaron en las diferentes metodologías desarrolladas en el presente trabajo de investigación

### **3.1.7 Calidad del DNA**

Para obtener los datos de este parámetro, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% cargando 5  $\mu\text{L}$  del stock de DNA por pozo, previamente mezclado con buffer de carga en una cámara horizontal GIBCO BRL®. El tiempo de corrido duró una hora a 110 volts. Transcurrido ese tiempo, el gel se colocó en bromuro de etidio a 0.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de Molecular SIGMA Biology por 5-10 min. Transcurrido ese tiempo, el gel se enjuagó

en agua y se documentó usando un trasiluminador Dual Intensity UVP de luz ultravioleta modelo TS-20 y el programa KodaK Digital Science 1D V.20.3.

### 3.1.8 Identificación y diferenciación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* de aislamientos de *Fusarium oxysporum* procedentes de Sinaloa, Michoacán y Guanajuato

Para la identificación específica de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* de la colección de *Fusarium oxysporum* existente en el Laboratorio de Biología Molecular antes referida, se emplearon los iniciadores (primers) Foc0-12f y Foc0-12r para PCR, cuyas secuencias se muestran en el cuadro 20. Estos iniciadores amplifican un único fragmento de DNA de 1,5 kb en aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, independientemente de la raza a la que pertenecen y de su origen geográfico. Este par de primers fue diseñado por Jiménez (2001) del cual ya ha sido comprobada su capacidad de diagnóstico por la misma autora.

Cuadro 20. Secuencias de los iniciadores que se utilizaron en la PCR específica para la identificación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*

| Iniciador | Secuencia (5'-3')           | Tamaño del fragmento |
|-----------|-----------------------------|----------------------|
| Foc0-12f  | GCGTTTCGCAGCCTTACAATGAAG    | 1,5 kb               |
| Foc0-12r  | GACTCCTTTTCCCGAGGTAGGTCAGAT |                      |

#### 3.1.8.1 Reacciones de amplificación con PCR

Para la identificación de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* del total de aislamientos de *Fusarium oxysporum* procedentes de Sinaloa y de la colección referida (que hicieron un total de 144 aislamientos), se realizó una amplificación de PCR específica con los iniciadores mencionados en el Cuadro 18. La mezcla de los componentes de reacción por muestra se indica en el cuadro 21

Cuadro 21. Reactivos, concentración del stock y volumen del stock utilizado para la identificación específica de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*

| Reactivo                | Stock <sup>1</sup>                   | $\mu\text{L}$ <sup>2</sup> | Total <sup>3</sup> | Final <sup>4</sup>                   |
|-------------------------|--------------------------------------|----------------------------|--------------------|--------------------------------------|
| Agua libre de nucleasas | -----                                | 1.6                        | -----              | -----                                |
| Buffer de <i>Taq</i>    | 10X                                  | 2.5                        | 25 X               | 1X                                   |
| Foc 12f                 | 10 pmol $\mu\text{L}^{-1}$           | 2                          | 20 pmol            | 0.8 pmol $\mu\text{L}^{-1}$          |
| Foc 12r                 | 10 pmol $\mu\text{L}^{-1}$           | 2                          | 20 pmol            | 0.8 pmol $\mu\text{L}^{-1}$          |
| dNTP                    | 500 $\mu\text{M}$ $\mu\text{L}^{-1}$ | 10                         | 5000 $\mu\text{M}$ | 200 $\mu\text{M}$ $\mu\text{L}^{-1}$ |
| MgCl <sub>2</sub>       | 25 mM $\mu\text{L}^{-1}$             | 1.5                        | 37.5 mM            | 0.75 mM $\mu\text{L}^{-1}$           |
| <i>Taq</i> polimerasa   | 5 U $\mu\text{L}^{-1}$               | 0.4                        | 1.5 U              | 0.03 U $\mu\text{L}^{-1}$            |
| DNA <sup>5</sup>        | 20 ng $\mu\text{L}^{-1}$             | 5                          | 100 ng             | 4 ng $\mu\text{L}^{-1}$              |
| <b>Total</b>            |                                      | <b>25</b>                  |                    |                                      |

1. Concentración del Stock de cada uno de los reactivos empleados, 2: volumen tomado del stock para cada reactivo; 3: total de cada reactivo presente en 25  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción; 4: concentración final de los reactivos; 5: el DNA se adicionó de manera individual a cada tubo según el número de aislamientos a evaluar.

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador modelo 9700 Applied Biosystems® y los ciclos de temperatura consistieron de 2 minutos por 94 °C para la pre-desnaturalización del DNA y 28 ciclos de 30 segundos a 94 °C para la desnaturalización del DNA, 1 min a 58 °C para el alineamiento de los iniciadores y 30 segundos a 72 °C para la extensión; y un ultimo paso de 4 min a 72 °C para producir fragmentos completos de DNA de doble cadena.

### 3.1.8.2 Electroforesis de la amplificación

Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa 1.2 % utilizando 10  $\mu\text{L}$  de la reacción y se mezclaron con 2  $\mu\text{L}$  del buffer de carga. Las muestras se corrieron en una cámara horizontal GIBCO BRL®. El tiempo de corrido duro una hora a 110 voltios. Transcurrido ese tiempo, el gel se colocó en bromuro de etidio a 0.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de Molecular SIGMA Biology por 5-10 min. Después, el gel se enjuagó en agua y se documentó usando un transiluminador Dual Intensity UVP de luz ultravioleta modelo TS-20 y el programa Kodak Digital Science 1D V.20.3.

### 3.1.9 Comparación de aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* de México respecto a controles positivos de razas de este patógeno procedente de USA.

Para comparar las medidas en este parámetro se contó con DNA de las razas 1, 2, 3, 4 y 5 proporcionados por el DR. Fred J. Muehlbauer de Washington State University, Research, Education, and Economics Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture (USDA-ARS), los cuales se usaron como controles positivos en la caracterización de aislamientos de México que resultaron positivos a *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*. Para la caracterización molecular, se emplearon dos técnicas: ISSR y AFLP.

#### 3.1.9.1 Selección de iniciadores ISSR

Los marcadores ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat, por sus siglas en inglés) son obtenidos con PCR utilizando un solo iniciador o primer, cuya composición está basada en secuencias repetidas (motif) de dinucleótidos o trinucleótidos. El número de dinucleótidos o trinucleótidos varía, pero en general consta de al menos 14 de ellos. Las secuencias de los primers de microsatélites pueden ser anclados con uno o dos nucleótidos extras en sus extremos 5' o 3' (Wolfe, 2005)

Los primers anclados son más específicos, ya que además de seleccionar la región correspondiente al microsatélite, se deben complementar las bases adicionales, lo que conlleva a que la especificidad de los productos seleccionados se incremente, de acuerdo al número de bases que conformen el ancla una vez que los fragmentos de DNA se han sintetizado (Valadéz, *et al.*, 2001)

De los aislados que resultaron positivos a *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* se seleccionó uno de ellos para amplificarlo con los 21 iniciadores ISSR (Cuadro 22), de los cuales, se seleccionaron aquellos que proporcionaron mayor cantidad y calidad de fragmentos polimórficos.

Cuadro 22. Relación de iniciadores ISSR utilizados sobre los DNA de los aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* de México y DNA de las razas 1, 2, 3, 4, y 5 de USA.

| PRIMERS                           | NOMBRE | PRIMERS                | NOMBRE |
|-----------------------------------|--------|------------------------|--------|
| (AG) <sub>8</sub> C               | M1     | (GT) <sub>6</sub> -AY  | M13    |
| (GT) <sub>8</sub> A               | M2     | (CT) <sub>8</sub> -RG  | M14    |
| (CA) <sub>8</sub> C               | M3     | (CTC) <sub>4</sub> -RC | M15    |
| (AC) <sub>8</sub> G               | M4     | (GT) <sub>6</sub> -RG  | M16    |
| (AC) <sub>8</sub> C               | M5     | (GT) <sub>6</sub> -RC  | M17    |
| (GA) <sub>8</sub> A               | M6     | (CT) <sub>10</sub> T   | M18    |
| (GA) <sub>8</sub> C               | M7     | (AG) <sub>10</sub> T   | M19    |
| (AG) <sub>8</sub> G               | M8     | (CT) <sub>10</sub> A   | M20    |
| T <sub>3</sub> (ATT) <sub>4</sub> | M9     | (CT) <sub>10</sub> G   | M21    |
| (YR) <sub>8</sub> RYRY            | M11    | CT(ATCT) <sub>6</sub>  | M22    |
| T(GT) <sub>9</sub>                | M12    |                        |        |

Las reacción ISSR-PCR se llevó a cabo en un termociclador modelo 9700 Applied Biosystems® con el siguiente programa: un ciclo a 94 °C por 1.5 minutos para la pre-desnaturalización del DNA; 35 ciclos de 94 °C por 40 segundos para la desnaturalización, 45 °C por 45 segundos para el alineamiento del primer y 72 °C por 1.5 minutos para la extensión del primer; un ciclo a 94°C por 45 segundos para una última desnaturalización de hebras y finalmente 72° por 5 minutos para la extensión final. La mezcla de reacción por tubo fue como se describe en el cuadro 23

Cuadro 23. Reactivos, concentración del stock y volumen utilizado para la amplificación selectiva de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*

| Reactivo                         | Stock <sup>1</sup>       | μL <sup>2</sup> | Total <sup>3</sup> | Final <sup>4</sup>        |
|----------------------------------|--------------------------|-----------------|--------------------|---------------------------|
| Agua libre de nucleasas          | -----                    | 3.2             | -----              | -----                     |
| Buffer de Taq                    | 10X                      | 2.5             | 25 X               | 1X                        |
| Iniciador ISSR                   | 10 pmol μL <sup>-1</sup> | 2               | 20 pmol            | 0.8 pmol μL <sup>-1</sup> |
| dNTP                             | 500 μM μL <sup>-1</sup>  | 10              | 5000 μM            | 200 μM μL <sup>-1</sup>   |
| MgCl <sub>2</sub>                | 25 mM μL <sup>-1</sup>   | 2.0             | 37.5 mM            | 0.75 mM μL <sup>-1</sup>  |
| Taq polimerasa                   | 5 U μL <sup>-1</sup>     | 0.3             | 2.0 U              | 0.08 U μL <sup>-1</sup>   |
| DNA <sup>5</sup>                 | 20 ng μL <sup>-1</sup>   | 5               | 100 ng             | 4 ng μL <sup>-1</sup>     |
| <b>Volumen total de reaccion</b> |                          | <b>25</b>       |                    |                           |

1. Concentración del Stock de cada uno de los reactivos empleados, 2: volumen tomado del stock para cada reactivo; 3: total de cada reactivo presente en 25μL de la mezcla de reacción; 4: concentración final de los reactivos; 5: el DNA adicionó de manera individual según el número de aislamientos evaluados.

### 3.1.9.2 Geles de acrilamida al 8%

Para separar los fragmentos de la reacción ISSR-PCR, se utilizaron geles de acrilamida en una cámara vertical C.B.S Scientific CO<sup>®</sup>. Modelo MYG-216-33 y una fuente de poder E-C Apparatus Corporation<sup>®</sup>, Modelo EC-105. Los cristales de la cámara se limpiaron con etanol al 70% y papel KimWipes<sup>®</sup> procurando que no hubiese residuo de ningún tipo, los cristales se ensamblaron según las instrucciones del fabricante para formar el sándwich; dos por cámara. En un aplicador se midió 22 mL de poliacrilamida (Acrilamida-Bisacrilamida 29:1 (p/p) al 40 % (p/v)), 11 mL de TBE 10X, 77 mL de agua destilada estéril, 65 µL de TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine) SIGMA<sup>®</sup> y 440 µL al 25 % de Persulfato de amonio (p/v) SIGMA<sup>®</sup>; se agitó manualmente por dos segundos y se agregó a los cristales hasta unos 4 cm. antes del tope, se colocaron los peines de 50 pozos y enseguida se llenaron los cristales cuidando que no quedara ninguna burbuja de aire. 45 minutos después de la polimerización, se ensamblaron los cristales (sándwich) a la cámara, se le agregó buffer de corrida TBE 1X, se retiraron los peines, se lavaron los pozos bombeándole buffer de corrimiento y enseguida se cargaron 3.5 µL de la reacción por pozo. Previamente por tubo de reacción de 25 µL se le agregó 6 µL de buffer de carga. Las muestras se corrieron a 245 voltios por 2.45 hrs.

### 3.1.9.3 Tinción y lavado del gel

Después de retirar los sándwiches de cristal, desarmarlos y despegar los geles, se sumergieron en la solución fijadora (ácido acético glacial al 10 %) por 15 minutos en agitación constante, se retiraron de esta solución y se sumergieron en agua destilada por 6 minutos en agitación, se desechó el agua y se les agregó la solución de tinción (nitrato de plata al 0.1 % mas 1.5 mL de formaldehído al 37 % por litro de agua destilada) por tres minutos cuando esta solución fue nueva. Posteriormente se retiró esta solución y se enjuagaron los geles con agua destilada por no más de 5 segundos y se sumergieron en la solución reveladora (NaOH al 3.0 % mas 1µL de formaldehído al 37 % por mL de

solución reveladora) en agitación constante hasta que se revelaron todas las bandas. Para detener el revelado los geles se sumergieron nuevamente en la solución fijadora.

#### **3.1.9.4 Fotodocumentación de geles**

Finalmente los geles se fotodocumentaron empleando el software Kodak Digital Science 1D V.2.0.3. y un Transiluminador de luz blanca.

#### **3.1.10 Comparación de perfiles de bandas de DNA generadas con AFLP (Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados)**

El método de AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism, por sus siglas en ingles) tiene la cualidad de reunir ventajas de RFLP y PCR en cuanto a reproducibilidad de los ensayos y amplificación con capacidad para diferenciar múltiples marcadores en una muestra. El principio de la técnica es la amplificación selectiva de fragmentos de restricción. El DNA de los individuos es digerido con enzimas de restricción, una de corte frecuente (reconoce cuatro pares de bases) y otra de corte raro (reconoce seis pares de bases), rutinariamente se puede utilizar MseI y EcoRI respectivamente. Posteriormente, adaptadores sintéticos específicos se ligan a cada extremo del DNA digerido y ésta mezcla se somete a una PCR preliminar, empleando iniciadores específicos a los adaptadores. Éstos iniciadores además, tienen un nucleótido, por ejemplo A (adenina), por tanto solo se amplificaran aquellos fragmentos en los cuales el sitio de restricción es seguido inmediatamente por una T (timina); que es complementaria a la A del iniciador. Una segunda amplificación se realiza utilizando el mismo iniciador anterior, pero esta vez con dos nucleótidos selectivos (+2) (A mas A, T, G o C), por lo que solo se amplificaran aquellos fragmentos en que la secuencia contigua al sitio de restricción sea T mas la base complementaria; por tanto se reduce aun mas la cantidad de fragmentos a visualizar (Pérez, 2000)

El DNA de aislamientos de México que resultaron positivos a *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* y el DNA de las razas 1, 2, 3, 4, y 5 de este patógeno procedentes de USA fueron sometidos al análisis por la metodología de AFLP empleando el Kit AFLP® Analisis System I de Invitrogen que consistió de tres pasos principales:

### 3.1.10.1 Digestión del DNA de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*

Para la digestión de nuestros DNA problemas se consideraron los reactivos indicados en el cuadro 24. Los tubos fueron incubados en una cámara de hibridación a 37 °C por 2 horas

Cuadro 24. Orden y Volumen de reactivos para la digestión de DNA de cada aislamiento de *Fusarium oxysporum* f. sp *ciceris* analizado con AFLP.

| Reactivos             | Volumen en µL |
|-----------------------|---------------|
| Buffer de reacción 5X | 5.0           |
| DNA <sup>1</sup>      | 3.0           |
| EcoRI/Mse I           | 2.0           |
| Agua destilada        | 15.0          |
| Volumen Total         | 25.0          |

<sup>1</sup>DNA: Volumen de la dilución que contiene 300 ng de DNA de cada aislamiento evaluado

Transcurrida las dos horas, los tubos fueron incubados en baño maría por 15 min. a 70 °C para inactivar las endonucleasas de restricción. Después fueron colocados en hielo por 5 minutos y luego centrifugados brevemente para bajar la muestra.

### 3.1.10.2 Ligaciones de adaptadores

A cada tubo con el DNA de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* digerido se le agregó lo siguiente (Cuadro 25). Para ello se calculó el volumen de cada componente según el número de muestras a analizar. Después de adicionar la mezcla correspondiente, los tubos se incubaron toda la noche (12 horas) a la temperatura ambiente del laboratorio.

Cuadro 25 Orden de medición y volumen de los componentes de ligación que se le agregó a cada tubo con DNA de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* digerido.

| Componentes                         | Volumen en $\mu$ l |
|-------------------------------------|--------------------|
| Solución de ligación de adaptadores | 24.00              |
| T4 DNA ligasa                       | 1.00               |
| <b>Volumen total por muestra</b>    | <b>25.00</b>       |

Posteriormente se realizó una dilución de 1:10 de la mezcla de ligación de cada aislamiento (tubos) de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* evaluados en el presente trabajo, para lo cual se midieron 10  $\mu$ L de la mezcla de ligación y se transfirió éste volumen a un tubo de 500  $\mu$ L, al cual se le agregó 90  $\mu$ L de Buffer TE y se mezcló por centrifugación 15 segundos, el resto de la mezcla de ligación se almacenó a -20 °C.

### 3.1.10.3 Reacción de preampliación

Para la reacción de preamplificación se midieron los componentes en un tubo Eppendorf de 1.5 mL según el número de muestras a evaluar, se mezclaron bien y se repartieron según el volumen de la mezcla indicada en tubos de reacción de 200  $\mu$ L (Cuadro 26). Posteriormente a cada tubo se le agregó la dilución del DNA (1:10) ligado de las muestras evaluadas. A cada tubo se le agregó el equivalente a 25  $\mu$ L de aceite mineral y se mezclaron por centrifugación por 15 segundos antes de colocarlos en el termociclador. Las condiciones de termociclaje fueron 20 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 56 °C por 60 segundos y 72 °C por 60 segundos. Finalmente se almacenaron las muestras a 4 °C

**Cuadro 26.** Volumen de cada componente para la reacción de preamplificación de DNA de los aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* evaluados.

| Componentes                                           | Volumen $\mu$ L |
|-------------------------------------------------------|-----------------|
| DNA templado diluido ligado                           | 5.00            |
| Mix de primer pre-amp                                 | 40.00           |
| Buffer de PCR 10X con Mg                              | 5.00            |
| <i>Taq</i> DNA polimerasa <sup>1</sup> (5 U/ $\mu$ L) | 1.00            |
| <b>Volumen Total</b>                                  | <b>51.00</b>    |

<sup>1</sup> No viene incluido en el Kit de AFLP; se empleo el reactivo de Fermentas

De los productos de la preamplificación se realizó una dilución de 1:10 de cada muestra evaluada. Para lo cual se transfirió 10  $\mu$ L del producto de pre-amplificación a un tubo de 500  $\mu$ L y se le agrego 90  $\mu$ L de TE Buffer.

#### 3.1.10.4 Reacción de amplificación selectiva

Para la amplificación selectiva, se eligieron previamente una combinación de iniciadores del Kit de AFLPs y se optó por aquellas que dieron una mayor amplificación de fragmentos después de una electroforesis en poliacrilamida al 6%. La combinación de iniciadores se muestra en el cuadro 27 los cuales fueron etiquetados con una letra para identificarlos como tratamientos sobre las muestras evaluadas.

**Cuadro.27** Combinación preliminar de primer selectivos del Kit de AFLP usados como tratamientos sobre las muestras de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*

| Primer EcoRI | Primer MseI |          |          |          |          |          |          |          |          |
|--------------|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
|              | M-CAA       | M-CAC    | M-CAG    | M-CAT    | M-CTA    | M-CTC    | M-CTG    | M-CTT    | M-CGC    |
| E-ACG        | <b>A</b>    | <b>B</b> | <b>C</b> | <b>D</b> | <b>E</b> | <b>F</b> | <b>G</b> | <b>H</b> | <b>J</b> |
| E-AAC        |             |          |          |          |          |          | <b>I</b> |          |          |

Primer Eco RI (27.8 ng  $\mu$ l); Primers MseI (6.7 ng/ $\mu$ l, dNTPs)

La reacción de amplificación selectiva se preparó midiendo cada uno de los componentes (Cuadro 28) por tratamiento según las indicaciones del manual del Kit de AFLP y, multiplicándolo por el número total de muestras a evaluar. Las mezclas de reacción se prepararon en dos tubos independientes, llamados mix1 y mix 2. Posteriormente se repartió cada mix entre los tubos correspondientes al número de muestras evaluadas, a los cuales se les agregó la muestra respectiva de DNA preamplificado y diluido (1:10). Posteriormente a cada tubo se le adicionó dos gotas de aceite mineral (equivalente a 25  $\mu\text{L}$ ) y se mezclaron durante 15 segundos por centrifugación antes de colocarlos en el termociclador. Para la reacción de amplificación selectiva, se usó el siguiente programa: 14 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 65 °C por 30 segundos, 72 °C por 1 minuto y, 23 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 56 °C por 30 segundos, 72 °C por 1 minuto. Finalmente se almacenaron las muestras a 4°C.

Cuadro 28. Orden en que se realizaron las mediciones de los componentes por tratamiento (combinación de iniciadores) al que fueron sometidos las muestras evaluadas en AFLPs.

| Mix 1                                          |                          |
|------------------------------------------------|--------------------------|
| Componente                                     | Volumen en $\mu\text{L}$ |
| Primer EcoRI                                   | 5.00                     |
| Primer MseI (con dNTPs)                        | 45.00                    |
| <b>Volumen Total (para 10 reacciones)</b>      | <b>50.00</b>             |
| Mix 2                                          |                          |
| Agua Destilada                                 | 79.00                    |
| Buffer de PCR 10X con Mg                       | 20.00                    |
| Taq DNA polimerasa (5U $\mu\text{L}^{-1}$ )    | 1.00                     |
| <b>Volumen Total (para 10 reacciones)</b>      | <b>100.00</b>            |
| MEZCLA DE MIX Y ADICIÓN DE DNA PRE-AMPLIFICADO |                          |
| Mix 1 (Iniciadores mas dNTPs)                  | 5.00                     |
| Mix 2 (Taq DNA polimerasa mas buffer)          | 10.00                    |
| DNA templado diluido (1:10)                    | 5.00                     |
| <b>Volumen total por tubo de reacción</b>      | <b>20.00</b>             |

### 3.1.10.5 Electroforesis de los productos de AFLPs

Para el análisis de los marcadores AFLPs generados, el producto de la amplificación selectiva se separó en un gel desnaturalizante. El gel de poliacrilamida se preparó al 6% (19:1 de Acrilamida: Bisacrilamida (p/p); Urea a 7.5 M; Buffer TBE 1X). Para separar los fragmentos de la amplificación final se usó una cámara vertical de secuenciación BIORAD® y una fuente de poder E-C Apparatus Corporation®, Modelo 3000PW.

Los componentes de la cámara se trataron por separado y con un par de guantes para cada componente (cristal y acrílico, respectivamente). Primeramente se limpiaron tres veces con etanol al 70% y papel KimWipes® procurando al máximo que no hubiese residuo de ningún tipo. El cristal se trató con BindSilane (1900 µL etanol absoluto grado reactivo, 90 µL de agua destilada estéril, 10 µL de ácido acético glacial grado reactivo y 10 µL de BindSilane puro) aplicándole 1 mL y en seguida con una papel KimWipes® se distribuyó uniformemente y en una sola dirección. El acrílico se trató con 1 mL de sigmacote de la misma forma. Los tratamientos con el BindSilane y el sigmacote se realizaron dentro de una cámara de extracción de vapores y gases. Estos reactivos se dejaron secar por 15 minutos, y después se limpiaron nuevamente con etanol al 70 % y papel KimWipes® en una sola dirección y luego perpendicular a la primera para uniformizar la distribución de los compuestos, después se dejaron reposar otros 3 minutos. El objeto del tratamiento es fijar el gel al cristal con BindSilane y lo opuesto (evitar que se adhiera) con sigmacote en el acrílico, de ahí la importancia de tratar por separado los componentes de la cámara (evitar la contaminación)

Finalizado el tratamiento, se procedió a armar la cámara, etapa en el cual se empleó otro par de guantes. Para el armado se colocaron los separadores para un gel de 0.4 mm de espesor y se dispusieron de frente las caras tratadas de los componentes de la cámara evitando tocarlas. Se colocaron las abrazaderas y se alinearon por la base el cristal y el acrílico sobre una superficie nivelada. En seguida se procedió a preparar la acrilamida para sellar la parte inferior (base) de la cámara; para ello se midió en un vaso de precipitado 5 mL de la misma acrilamida para electroforesis de las muestras, se le

agregó 8  $\mu$ L de TEMED y 8  $\mu$ L de APS (persulfato de amonio) al 25% (p/v), se mezclaron y en seguida se procedió a sellar la base de la cámara aplicando la acrilamida al espacio entre los dos cristales con una pipeta de 200  $\mu$ L, cuidando de no derramarlo y formando un sello uniforme de 2 cm de ancho aproximadamente a lo ancho de la cámara, se dejó polimerizar por 15 minutos.

Después de la polimerización del sello, en un aplicador se midió 55 mL de la poliacrilamida al 6%, se le agregó 55  $\mu$ L de TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine) SIGMA® y 67  $\mu$ L al 25 % de Persulfato de amonio (p/v) SIGMA®; se agitó manualmente por dos segundos y se procedió a llenar el espacio de los cristales, esto se hizo lentamente para evitar la formación de burbujas; en seguida del llenado, se introdujo el peine por la parte posterior a una profundidad poco menos de 4 mm de la longitud de los dientes, esto para que la superficie de la acrilamida una vez polimerizada fuese completamente recta, después de colocar el peine se le agregó un poco más de acrilamida para uniformizar el llenado. Se dejó polimerizar el gel por 1.15 horas.

Posteriormente se retiró el peine y se procedió a montar la cámara de secuenciación, a la cual se le agregó buffer de corrida TBE 1X precalentado a 65 °C y se llevó a cabo una pre-electroforesis del gel por 30 min a un poder constante de 80 W evitando que la temperatura del buffer de corrida sobrepasara los 55 °C; la pre-electroforesis se realizó para eliminar urea precipitada. Durante la pre-electroforesis del gel, los productos de la amplificación selectiva (después del termociclaje se les agregó un volumen de buffer de carga con formamida) se calentaron por 6 minutos a 94 °C para desnaturalizar el DNA y en seguida se colocaron sobre hielo para mantener la estructura del DNA desnaturalizado y recto. Finalizada la pre-electroforesis del gel se colocó el peine y en seguida se cargaron 10  $\mu$ L de los productos amplificados y desnaturalizados. Las muestras se corrieron a un poder constante de 80 W (en promedio 1000 voltios) por 1.15 horas; en cuanto las muestras migraron por el gel (5 minutos después de iniciar la corrida) se retiró el peine. Durante la corrida se estuvo monitoreando a intervalos de 15 minutos la temperatura del buffer de corrida cuidando que no sobrepasara los 55 °C.

### **3.1.10.6 Tinción y lavado del gel**

Finalizada la electroforesis, se drenó el buffer de corrida y se separaron los componentes de la cámara. Para revelar la migración de los marcadores de AFLPs se procedió de la siguiente manera:

El cristal al cual se adhirió el gel, se sumergió en una bandeja con ácido acético glacial al 10 % y se dejó en agitación constante por 25 minutos. Se retiraron de esta solución y se sumergieron en agua destilada por 6 minutos en agitación constante, se desechó el agua y se les agregó la solución de tinción (1 g de nitrato de plata,  $\text{AgNO}_3$ , 1.5 mL de formaldehído en un litro de agua destilada) por 30 minutos cuando ésta solución fue nueva. Posteriormente se retiró ésta solución y se enjuagó el gel (cristal) con agua destilada por no más de 5 segundos dejando escurrir el exceso de líquido.

### **3.1.10.7 Revelado del gel**

Para el revelado de los marcadores de DNA, el gel (cristal) se colocó en una bandeja y se le agregó la solución reveladora. La solución reveladora se preparó con dos horas de anticipación para dejarla en refrigeración antes de usarla (dilución de 60 g de carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) en 2 L de agua destilada). La temperatura de la solución reveladora se trabajó a 6 °C, y justo antes de usarse se le agregó 3 mL al 37% de formaldehído y 400  $\mu\text{L}$  a 10  $\text{mg mL}^{-1}$  de tiosulfato de sodio. Esta solución se dividió en dos partes, 1 litro se vertió a la bandeja con el gel (cristal) y el resto se mantuvo en refrigeración; el gel se mantuvo en agitación constante hasta que aparecieron las primeras bandas (4 min en promedio), inmediatamente se desechó la solución reveladora y se le agregó el resto de la solución “fría” y se dejó en agitación nuevamente para continuar el revelado del resto de los fragmentos de DNA. Se suspendió el revelado cuando se consideró que más tiempo causaría una sobre tinción del gel dificultando la visión de las bandas (15 min en promedio). Otro parámetro que se usó fue suspender la tinción cuando el gel empezó a tornarse oscuro. Para detener la tinción el gel (cristal) se sumergió nuevamente en la primera solución.

### 3.1.10.8 Fotodocumentación de los geles de AFLP

Finalmente los geles se fotodocumentaron empleando el software Kodak Digital Science 1D V.2.0.3. y un transiluminador de luz blanca.

### 3.1.11 Comparación de secuencias del factor de elongación y de la traducción 1 $\alpha$ (*EF1 $\alpha$* ) de aislamientos procedentes de Guanajuato y Michoacán

A partir de la colección de *Fusarium* existente en el Laboratorio de Biología Molecular del departamento de Fitotecnia de la UACH, se seleccionaron 34 aislamientos obtenidos de plantas enfermas de garbanzo, previamente estudiadas y caracterizadas por Cámara (2001) y Luna (2002) (Cuadro 29). Se aisló DNA y se amplificó y secuenció el gen del factor de elongación y de la traducción 1 $\alpha$  (*EF1 $\alpha$* ), que es uno de los genes altamente conservados entre las especies y que se ha estudiado para determinar relaciones filogenéticas; e incluso, se ha utilizado entre los organismos de una misma especie o de un mismo género para conocer el parentesco entre los organismos estudiados.

Para la extracción de DNA, los aislamientos fueron crecidos en medio de cultivo PDA.

Cuadro 29. Relación de aislamientos procedentes del estado de Guanajuato y Michoacán que se emplearon para amplificación y comparación de secuencias del gen *EF 1 $\alpha$*

| C. M. | CLAVE | ESTADO    | LOCALIDAD DE ORIGEN | SINTOMA        |
|-------|-------|-----------|---------------------|----------------|
| 2     | MC2   | Michoacán | El calvario         | Amarillamiento |
| 8     | MS8   | Michoacán | Singuio             | Amarillamiento |
| 9     | MS9   | Michoacán | Singuio             | Amarillamiento |
| 10    | MS10  | Michoacán | Singuio             | Amarillamiento |
| 14    | MP14  | Michoacán | La purísima         | Amarillamiento |
| 15    | MP15  | Michoacán | La purísima         | Amarillamiento |
| 21    | MM21  | Michoacán | Morelia             | Marchitez      |
| 22    | MM22  | Michoacán | Morelia             | Marchitez      |
| 23    | MM23  | Michoacán | Morelia             | Marchitez      |
| 25    | MM25  | Michoacán | Morelia             | Amarillamiento |

| C. M. | CLAVE | ESTADO     | LOCALIDAD DE ORIGEN | SINTOMA                    |
|-------|-------|------------|---------------------|----------------------------|
| 26    | MM26  | Michoacán  | Morelia             | Amarillamiento y Marchitez |
| 31    | MM31  | Michoacán  | Morelia             | Amarillamiento y Marchitez |
| 35    | MCu35 | Michoacán  | Cuitzeo             | Amarillamiento             |
| 37    | MCu37 | Michoacán  | Cuitzeo             | Marchitez                  |
| 38    | MCu38 | Michoacán  | Cuitzeo             | Amarillamiento             |
| 41    | GP41  | Guanajuato | Puquichapio         | Amarillamiento             |
| 42    | GP42  | Guanajuato | Puquichapio         | Amarillamiento             |
| 43    | GP43  | Guanajuato | Puquichapio         | Amarillamiento             |
| 44    | GVS44 | Guanajuato | Valle de Santiago   | Amarillamiento             |
| 47    | GVS47 | Guanajuato | Valle de Santiago   | Amarillamiento             |
| 48    | GVS48 | Guanajuato | Valle de Santiago   | Marchitez                  |
| 53    | GYr53 | Guanajuato | Yuriria             | Marchitez                  |
| 55    | GYr55 | Guanajuato | Yuriria             | Marchitez                  |
| 57    | GYr57 | Guanajuato | Yuriria             | Marchitez                  |
| 58    | GSa58 | Guanajuato | Salvatierra         | Marchitez                  |
| 60    | GSa60 | Guanajuato | Salvatierra         | Marchitez                  |
| 62    | GSa62 | Guanajuato | Salvatierra         | Marchitez                  |
| 65    | GSa65 | Guanajuato | Salvatierra         | Asintomático               |
| 67    | GCl67 | Guanajuato | Celaya I            | Marchitez                  |
| 68    | GCl68 | Guanajuato | Celaya              | Marchitez                  |
| 69    | GJP69 | Guanajuato | Jaral del Progreso  | Marchitez                  |
| 71    | Glp71 | Guanajuato | Irapuato            | Marchitez                  |
| 72    | Glp72 | Guanajuato | Irapuato            | Marchitez                  |
| 74    | GVg74 | Guanajuato | Villagrán           | Marchitez                  |

C.M: Cultivo Monospórico y número consecutivo.

### 3.1.11.1 Amplificación del gen de factor de elongación y de la traducción $1\alpha$ ( $EF1\alpha$ )

Después de verificar la calidad del DNA y de determinar su concentración, se realizó una dilución a  $20 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ . Para la amplificación de una porción del gene del factor de elongación y traducción  $1\alpha$  ( $EF1\alpha$ ) se emplearon un par de iniciadores (Cuadro 30) y la amplificación selectiva se realizó en un termociclador modelo 9700 Applied Biosystems y los parámetros fueron: un ciclo de 30 s a  $94^\circ\text{C}$  para la predesnaturalización del DNA, 40 ciclos de 30 s a  $94^\circ\text{C}$ , 30 s a  $62^\circ\text{C}$ , y 1.5 min a  $72^\circ\text{C}$  y finalmente 2.5 min a  $72^\circ\text{C}$ . Las mezcla de los reactivos para la amplificación del gene del factor de elongación y de la traducción  $1\alpha$  ( $EF1\alpha$ ) por tubo de reacción se detalla en el cuadro 31. El volumen total de los reactivos requerido para 34 muestras de DNA mas dos muestras más para compensar el error de pipeteo se midieron en un tubo Eppendorf de 2 mL. La mezcla de

reactivos se distribuyó en cada tubo (20  $\mu\text{L}$ ) y posteriormente se le agregó el DNA (5  $\mu\text{L}$ ) a cada tubo.

Los productos de la amplificación fueron verificados por electroforesis de 5  $\mu\text{L}$  de la reacción mezclado con 2  $\mu\text{L}$  de buffer de carga en un gel de agarosa al 1.5 % seguido de una tinción en bromuro de etidio (10 mg  $\text{mL}^{-1}$ ) y visualizado sobre un transiluminador de UV como se describió anteriormente. Posteriormente los productos de la amplificación se secuenciaron y se compararon mediante BLAST con las secuencias reportadas en el GenBank.

Cuadro 30. Secuencias del iniciador que amplifica intrones del gen del factor de elongación y de la traducción 1 $\alpha$  (*EF1 $\alpha$* ) utilizado en el análisis de genealogías de *Fusarium oxysporum*

| Gen amplificado               | Iniciador | Secuencia del iniciador (5' a 3') <sup>a</sup> |
|-------------------------------|-----------|------------------------------------------------|
| <i>EF1<math>\alpha</math></i> | EF-1      | ATGGGTAAGGARGACAAGAC                           |
|                               | EF-2      | GGARGTACCAGRSATCTCATG                          |

<sup>a</sup>R=AG; S: CG.

Cuadro 31 Reactivos, concentración del stock y volumen utilizado para la amplificación selectiva del gene del factor de elongación y de la traducción 1 $\alpha$ (*EF1 $\alpha$* )

| Reactivo                         | Stock <sup>1</sup>                   | $\mu\text{L}$ <sup>2</sup> | Total <sup>3</sup> | Final <sup>4</sup>                   | $\mu\text{L}$ 36X <sup>5</sup> |
|----------------------------------|--------------------------------------|----------------------------|--------------------|--------------------------------------|--------------------------------|
| Agua libre de nucleasas          | -----                                | 1.2                        | -----              | -----                                | 43.2                           |
| Buffer de <i>Taq</i>             | 10X                                  | 2.5                        | 25 X               | 1X                                   | 90                             |
| Iniciador EF-1                   | 10 pmol $\mu\text{L}^{-1}$           | 2                          | 20 pmol            | 0.8 pmol $\mu\text{L}^{-1}$          | 72                             |
| Iniciador EF-2                   | 10 pmol $\mu\text{L}^{-1}$           | 2                          |                    | 0.8 pmol $\mu\text{L}^{-1}$          | 72                             |
| dNTP                             | 500 $\mu\text{M}$ $\mu\text{L}^{-1}$ | 10                         | 5000 $\mu\text{M}$ | 200 $\mu\text{M}$ $\mu\text{L}^{-1}$ | 360                            |
| MgCl <sub>2</sub>                | 25 mM $\mu\text{L}^{-1}$             | 2.0                        | 37.5 mM            | 0.75 mM $\mu\text{L}^{-1}$           | 72                             |
| <i>Taq</i> polimerasa            | 5 U $\mu\text{L}^{-1}$               | 0.3                        | 2.0 U              | 0.08 U $\mu\text{L}^{-1}$            | 10.8                           |
| DNA                              | 20 ng $\mu\text{L}^{-1}$             | 5                          | 100 ng             | 4 ng $\mu\text{L}^{-1}$              | 20                             |
| <b>Volumen total de reacción</b> |                                      | <b>25</b>                  |                    |                                      | <b>740</b>                     |

1. Concentración del Stock de cada uno de los reactivos empleados, 2: volumen tomado del stock para cada reactivo; 3: total de cada reactivo presente en 25  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción; 4: concentración final de los reactivos en 25  $\mu\text{L}$ ; 5: volumen de reactivos para una reacción de 36 muestras (tubos)

### 3.2 Fase de invernadero

Una vez que se obtuvieron resultados de la comparación de las secuencias del gen factor de elongación y de la traducción  $1\alpha$  (*EFL* $\alpha$ ) con las del GenBank de los 34 aislamientos de *Fusarium*, se seleccionaron solo aquellos que presentaron de 99% a 100% de similitud a las secuencias de las formas especiales de *Fusarium oxysporum* reportadas para evaluarlos mediante prueba de patogenicidad en plantas de variedades diferenciales de garbanzo, susceptibles a la mayoría de las razas reportadas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*. A su vez, se seleccionaron aquellos aislamientos que presentaron de 99 a 100% de similitud *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* para inocularlos sobre variedades diferenciales de garbanzo y ubicarlos por el patrón de síntomas a alguna de las razas reportadas.

#### 3.2.1 Plantas diferenciales y aislamientos evaluados

Para el caso de aquellos aislamientos que resultaron diferentes a *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* solo se emplearon dos variedades: Blanco Sinaloa 95 y JG-62, respectivamente; esto porque la primera es una variedad comercial y la segunda porque es susceptible a todas las razas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, excepto a la raza 0. Mientras que para aquellos aislamientos que presentaron una alta similaridad a la formas especiales *ciceris* fueron evaluados sobre las variedades JG-62, JG-74, CPS-1, BG-212 y WR-315 (Cuadro 32). Para la evaluación de los daños, se empleó la misma escala propuesto por Haware y Nene (1982b).

Cuadro 32. Variedades diferenciadoras utilizadas y su reacción a las razas conocidas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*

| VARIEDAD       | Raza de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> |    |      |   |   |   |   |   |
|----------------|---------------------------------------------------------|----|------|---|---|---|---|---|
|                | 0                                                       | 1A | 1B/C | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| JG-62          | R                                                       | S  | S    | S | S | S | S | S |
| JG-74          | R                                                       | R  | R    | S | R | R | M | R |
| CPS-1          | R                                                       | R  | R    | S | M | M | M | R |
| BG-212         | R                                                       | R  | R    | S | M | M | R | R |
| WR-315         | R                                                       | R  | R    | R | S | R | R | R |
|                | Formas especiales diferentes a <i>ciceris</i>           |    |      |   |   |   |   |   |
| Bco Sinaloa-92 |                                                         |    |      |   |   |   |   |   |
| JG-62          |                                                         |    |      |   |   |   |   |   |

R: Resistentes: (0-20% de marchitez); M: Moderadamente susceptible (21-50% de marchitez) y S: Susceptible ( $\geq 51$  % de marchitez)

Para cada variedad diferencial se utilizaron cinco plantas que fueron inoculadas con cada aislamiento. En el caso de los aislamientos que resultaron diferentes a *ciceris*, la escala para la evolución de la reacción de síntomas fue igual que la recomendada para la forma especial *ciceris*

Las variedades fueron colocadas bajo condiciones de invernadero a temperaturas que oscilaron entre 25 °C y 35 °C. El riego se realizó cada 72 horas.

### 3.2.2 Germinación de semillas

Las semillas de las variedades diferenciales de garbanzo se desinfestaron en 1.5+25% de hipoclorito de sodio libre y alcohol etílico, respectivamente. Las semillas permanecieron en esta solución por 15 min y en agitación manual por 30 segundos a intervalos de 2 minutos. Posteriormente se enjuagaron con agua destilada estéril tres veces para eliminar restos de la solución desinfestante. Posteriormente, se dejaron a la intemperie por 12 horas cubiertas con papel sanitas para su secado. Las semillas fueron colocadas en charolas de plástico; una por orificio y cubiertas con arena esterilizada 20 lb·cm<sup>-2</sup> por 20 min.

### **3.2.3 Incremento del inóculo**

Los aislamientos seleccionados fueron sembrados en cajas Petri con PDA; cuatro cajas por aislamiento por 7 días. Posteriormente a cada caja se le agregó agua destilada estéril ( $20 \text{ lb}\cdot\text{cm}^{-2}$  por 20 min) para colectar micelio, macro y microconidios. El medio de cultivo se fragmentó en pequeños trozos con una espátula estéril y fue agregado a la mezcla de arena y harina de maíz preparada en una proporción 9:1 (p/p), previamente esterilizadas a  $20 \text{ lb}\cdot\text{cm}^{-2}$  por 20 min. Este medio de cultivo infestado con el hongo fue colocado en bolsas de polietileno y en el invernadero se cubrieron con un plástico negro durante 15 días a una temperatura que osciló entre los 25 y 30 °C.

### **3.2.4 Inoculación**

Posteriormente la mezcla de arena y harina de maíz infestado se mezcló con suelo estéril en una proporción 1:12 (p/p). El suelo inoculado se humedeció y se dejó por tres días antes de transplantar las plántulas de garbanzo. Una vez que el hongo infestó el suelo, se transplantaron las plántulas. El transplante concluyó el 22 de agosto de 2006.

### **3.2.5 Evaluación de la respuesta de las variedades diferenciales de garbanzo a las inoculaciones de *Fusarium oxysporum***

Después del transplante, la evaluación de síntomas se realizó cada tercer día. Actividad que finalizó el 10 de octubre del mismo año. Debido a que se buscó evaluar la posible patogenicidad de los aislamientos, no se empleó un diseño experimental para estimar la severidad de los daños ocasionados por estos sobre las variedades de garbanzo.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSION

### 4.1 Aislamiento e identificación de *Fusarium oxysporum* de muestras del estado de Sinaloa

La colecta del estado de Sinaloa se dirigió sobre plantas que presentaron marchitez. Para el caso de los campos de investigaciones del INIFAP (Cuadro 18), las colectas se realizaron en lotes previamente establecidos; uno que está infestado de rabia, y que es utilizado por ésta institución para evaluar la resistencia de sus variedades de garbanzo. Las plantaciones de este lote se caracterizaron por presentar más del 80% con marchitez. La siguiente colecta se realizó sobre lotes anexos al lote de rabia, pero libres de inóculo; en los cuales, la presencia de plantas con marchitez y amarillamiento fue escasa. Las colectas realizadas al interior del estado también fue dirigida sobre plantas con síntomas de marchitez y la distribución de las plantas enfermas generalmente se presentó en manchones con diferente grado de severidad. En las parcelas con un manejo agronómico deficiente, la severidad de la enfermedad fue mayor, respecto a aquellas parcelas en donde se incorporaron fertilizantes orgánicos. Esto sugiere que no necesariamente los daños presentes en campo, pudieran haber sido ocasionados por *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, pues en el suelo hay un complejo de organismos que por la susceptibilidad de las plantas las atacan.

Para el aislamiento de *Fusarium* en el laboratorio, se colocaron 10 trozos de tejido vegetal por planta por caja Petri, de la cual se seleccionaron al azar 5 colonias que fueron resembradas en cajas Petri individuales. Esto hizo un total de 170 colonias, a partir de las cuales se obtuvieron colonias de una sola hifa. En la etapa de esporulación la cantidad se redujo a 65 colonias que presentaron las características morfológicas descritas para *Fusarium oxysporum* con base en las claves taxonómicas de Booth (1971).

#### 4.2 Extracción, Cuantificación y Calidad del DNA de *Fusarium oxysporum*.

Del total de aislamientos (144 aislamientos de los cuales 65 del estado de Sinaloa, 35 de Michoacán y 44 de Guanajuato, respectivamente) procesados para DNA fue posible obtener moléculas de buena calidad para la realización de las metodologías del presente trabajo. Las concentraciones de DNA obtenido variaron de  $43 \mu\text{g mL}^{-1}$  a  $654 \mu\text{g mL}^{-1}$  para la concentración más baja y la más alta, respectivamente.

#### 4.3 Identificación y diferenciación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* de aislamientos de *Fusarium oxysporum* procedentes de Sinaloa, Michoacán y Guanajuato.

Además de los 144 aislamientos, se incorporaron como controles positivos el DNA de las razas 1, 2, 3, 4 y 5 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* procedentes de USA. Después de la electroforesis del producto de amplificación con el par de iniciadores Foc0-12f y Foc0-12r; solo hubo amplificaciones en 10 de los aislamientos de México (Sinaloa, Guanajuato y Michoacán). La amplificación consistió de una banda de aproximadamente 1.5 kb que correspondió al tamaño del fragmento esperado. La reacción de amplificación se repitió en tres ocasiones independientes. En todos los casos los resultados fueron reproducibles. Se confirmó la capacidad diagnóstica del par de primers diseñado por Jiménez (2001) en reconocer una región genómica común para *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* independientemente de su origen geográfico y raza fisiológica al que pertenezcan; esto porque el tamaño del fragmento esperado fue igual para los aislamientos de México y de las cinco razas de USA. Resultados que ponen de manifiesto la precisión de emplear marcadores moleculares en el diagnóstico de fitopatógenos.

Inicialmente se venía considerando como *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* a todos los aislamientos precedentes de Guanajuato y Michoacán, de los cuales, Luna (2002) evaluó mediante perfiles generadas por RAPD-PCR 41 aislamientos, de éstos, solo el aislamiento referido como 48 (GVS48, Cuadro 19) correspondió a *F. oxysporum* f. sp.

*ciceris*, en tanto que Beltrán (2003) evaluó por perfiles de proteínas totales a 52 de los mismos aislamientos, de los cuales, dos correspondieron a *F. oxysporum* f sp *ciceris*, que fueron los aislamientos referido como 48 y 60 (GVS48 y GSa60, Cuadro 19). A su vez, Beltrán complementó su análisis con pruebas de patogenicidad con 20 aislamientos de las 52 que evaluó por proteínas, en cuya conclusión sugirió la presencia de las razas 3, 4 y 5 por la reacción de síntomas que observó en las líneas diferenciadoras; sin embargo, de las 20 que evaluó, solo el aislamiento 48(GVS) correspondió a *F. o. f. sp. ciceris*. A su vez Perales (2000) también mediante perfiles de proteínas totales de *Fusarium oxysporum* obtenidos de plantas de garbanzo del estado de Guanajuato, concluyó la posible existencia de la raza 1, 3 y 4 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, sin embargo, sus resultados no fueron complementados con pruebas de patogenicidad, simplemente correlacionó bandas de igual migración respecto a las reportadas por Susseelendra *et al.*, (1992).

De los 65 aislamientos de Sinaloa identificados como *Fusarium oxysporum* con las claves taxonómicas de Booth (1971), solamente seis de ellos correspondieron a *F. oxysporum* f. sp *ciceri* al utilizar los primers Foc0-12 R y F para detección específica con PCR. La complementación de métodos de estudios tales como la utilización de PCR, pruebas de patogenicidad y marcadores bioquímicos queda de manifiesto con las investigaciones de diferentes investigadores, entre los que sobresalen Jiménez (2001), Haware y Nene (1982b) y Susseelendra *et al.*, (1992) para el caso de la identificación de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*.

Cuadro 33. Aislamientos que resultaron positivos en la identificación de *F. oxysporum* f. sp *ciceris* mediante pruebas de PCR específicas.

| C. M. | CLAVE | ESTADO     | LUGAR DE ORIGEN            | SINTOMA        |
|-------|-------|------------|----------------------------|----------------|
| 44    | GVS44 | Guanajuato | Valle de Santiago          | Amarillamiento |
| 48    | GVS48 | Guanajuato | Valle de Santiago          | Marchitez      |
| 58    | GSa58 | Guanajuato | Salvatierra                | Marchitez      |
| 60    | GSa60 | Guanajuato | Salvatierra                | Marchitez      |
| 29    | --    | Sinaloa    | Angostura-Melchor          | Marchitez      |
| 30    | --    | Sinaloa    | Culiacán-Carretera 12      | Marchitez      |
| 34    | --    | Sinaloa    | Culiacán-lote-rabia-INIFAP | Marchitez      |

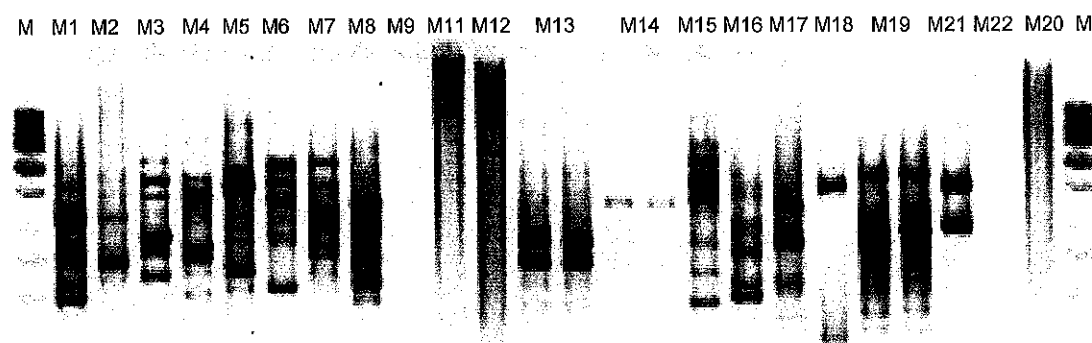
| C. M. | CLAVE | ESTADO  | LUGAR DE ORIGEN            | SINTOMA   |
|-------|-------|---------|----------------------------|-----------|
| 35    | --    | Sinaloa | Culiacán-lote-rabia-INIFAP | Marchitez |
| 36    | --    | Sinaloa | Culiacán-lote-rabia-INIFAP | Marchitez |
| 46    | --    | Sinaloa | Culiacán-Carretera 12      | Marchitez |

Resulta sorprendente que del total de los aislamientos utilizados en el presente trabajo identificados como *F. oxysporum* (144 diferentes aislamientos), solamente 10 de ellos (Cuadro 33) resultaron positivos para *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*; de los cuales cuatro fueron del estado de Guanajuato y seis de Sinaloa, respectivamente. Se considera que la información a nivel intraespecífica que proporcionarán estos aislamientos serán muy puntuales para las futuras investigaciones respecto al manejo fitosanitario del cultivo del garbanzo versus *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. Sin duda alguna, también resulta motivante saber que de los seis aislamientos que resultaron positivos a *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* del estado de Sinaloa, tres correspondieron a los de la parcela o lote con rabia del INIFAP. Esto explica el éxito que han tenido sus variedades en plantaciones comerciales para tolerar el ataque de este hongo y dar como resultado altos rendimientos y calidad de grano para exportación.

#### 4.4 Comparación de aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* de México respecto a controles positivos de razas de este patógeno procedente de USA.

Después de la evaluación de los 21 iniciadores de ISSR sobre el DNA de uno de los 10 aislamientos de hongos de México que resultaron positivos para *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*. Solo se seleccionaron 5 de ellos que presentaron una mayor amplificación de bandas (Figura 3)

Figura 3. Electroforesis de 21 perfiles de ISSR evaluados en un aislamiento de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*.



Gel de agarosa 1.5 % que muestra los perfil de bandas generadas por cada iniciador ISSR después de ser evaluados sobre el aislamiento 36 procedente del estado de Sinaloa que resultó positivo a *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*. Los carriles de los extremos corresponden al marcador de peso molecular de 1kb de Fermentas®. Las claves siguientes corresponden a la identificación de los primers ISSR.

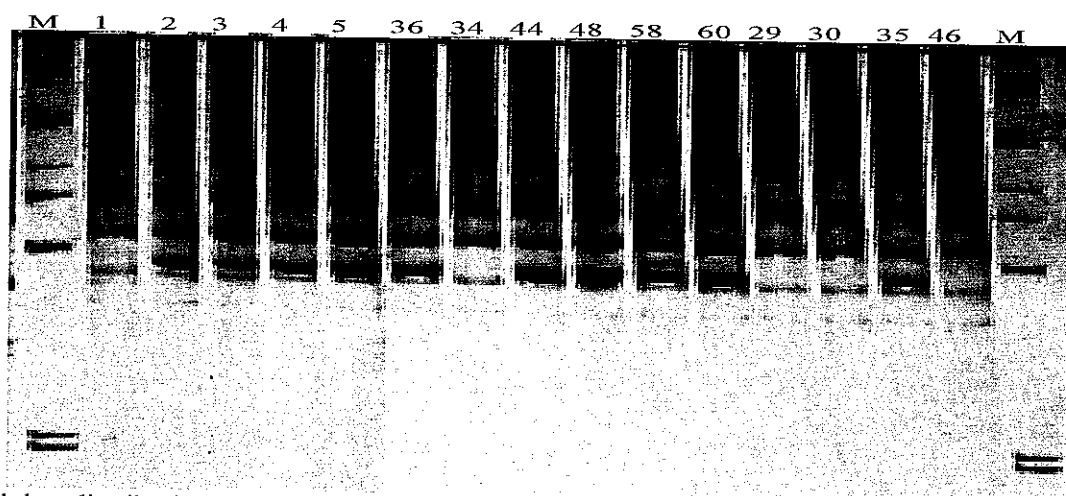
#### 4.4.1 Comparación de perfiles ISSR

Los productos de amplificación de los cinco iniciadores para ISSR (Cuadro 34) que se emplearon para comparar los 10 aislamientos positivos a *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* de México respecto a los controles positivos (razas uno a cinco de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* de USA), se muestran en las Figuras 4, 5 y 6. En cada uno de los perfiles electroforéticos, se aprecia una separación bien definida de las bandas por aislamientos y primer de ISSR.

Cuadro 34 Iniciadores ISSR utilizados sobre los DNA de los aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* de México y DNA de las razas 1,2,3,4, y 5 de USA.

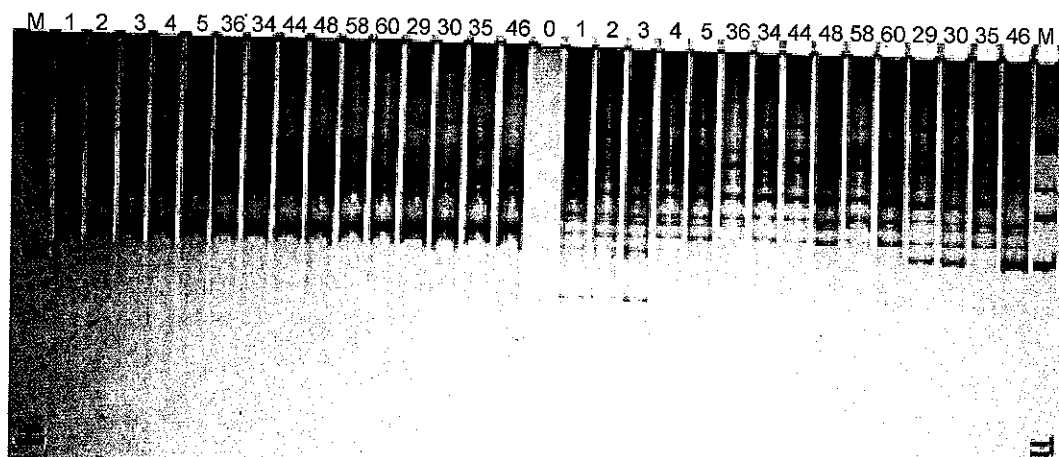
| PRIMERS                | NOMBRE |
|------------------------|--------|
| (AG) <sub>8</sub> C    | M1     |
| (CA) <sub>8</sub> C    | M3     |
| (GA) <sub>8</sub> A    | M6     |
| (GA) <sub>8</sub> C    | M7     |
| (CTC) <sub>4</sub> -RC | M15    |

Figura 4. Electroforesis de los productos de amplificación con el primer M1 de ISSR en los aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*.



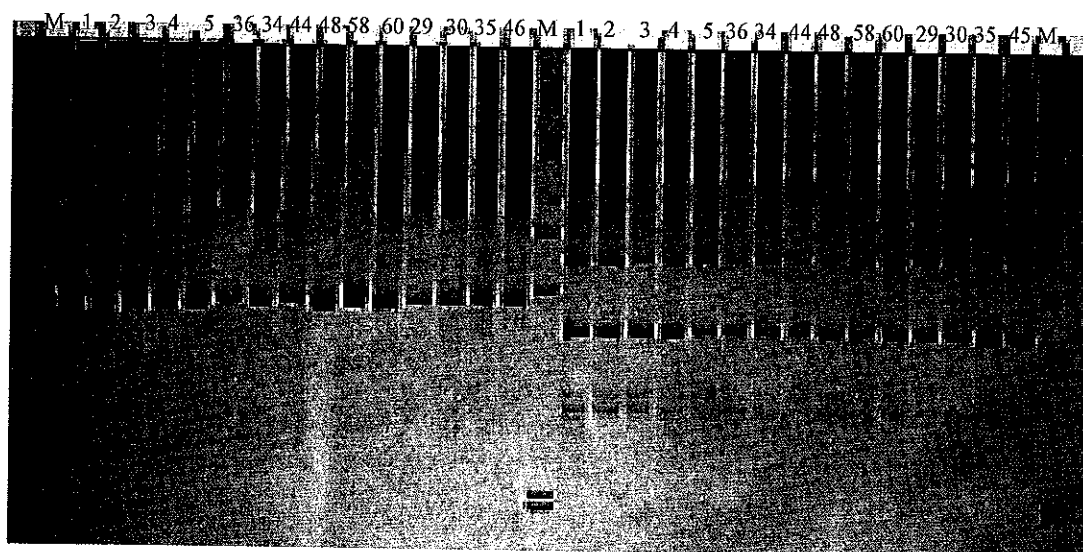
Gel de poliacrilamida 8%. Los carriles de los extremos corresponden al marcador de peso molecular de 1kb de Fermentas. Los primeros cinco carriles corresponden a las razas uno al cinco; el resto, a los aislamientos de México que resultaron positivos a *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*.

Figura 5. Electroforesis de los productos de amplificación con los primers M3 y M6 de ISSR en los aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*.



Gel de poliacrilamida 8%. Los carriles de los extremos corresponden al marcador de peso molecular de 1kb de Fermentas. El primer bloque corresponde a los productos de amplificación del primer M3 mientras que los del segundo bloque son del iniciador M6, respectivamente. Para ambos bloques, los primeros cinco carriles corresponden a las razas uno al cinco; el resto, a los aislamientos de México que resultaron positivos a *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*.

Figura 6. Electroforesis de los productos de amplificación de los primers ISSR M7 y M15 en los aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*.



l de poliacrilamida 8%. Los carriles de los extremos corresponden al marcador de peso molecular de 1kb de Fermentas. El primer bloque corresponde a los productos de amplificación con el primer M7 y el segundo para el primer M15, respectivamente. Para ambos bloques, los primeros cinco carriles corresponden a las razas uno al cinco; el resto, a los aislamientos de México que resultaron positivos a *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*.

#### 4.4.2 Comparación de perfiles AFLPs.

Las comparaciones de AFLPs se realizaron finalmente con la combinación de un primer de EcoR1 con dos primers diferentes de Mse1 (Cuadro 35).

Cuadro.35 Combinación de primers selectivos de AFLP utilizados en la comparación de aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*.

| Primer EcoR1                | Primer Mse1                 |
|-----------------------------|-----------------------------|
| 5'- gACTgCgTACCAATTCACg -3' | 5'- gATgAgTCCTgAgTAACAA -3  |
|                             | 5'- gATgAgTCCTgAgTAACTg -3' |

Primer Eco R1 (27.8 ng µl); Primers Mse1 (6.7 ng/µl, dNTPs)

#### 4.4.3 Análisis estadístico de marcadores ISSR y AFLP.

Con el objeto de conocer la relación genética entre los aislamientos de México que resultaron positivos para *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* respecto a las razas 1, 2, 3, 4, y 5 de la f. spp. *ciceris* procedentes de Estados Unidos, se realizó una matriz binaria combinando los datos generados para las 15 muestras evaluadas y cinco primers de ISSR. En la matriz se representaron la presencia o ausencia de los fragmentos amplificados como 1 y 0, respectivamente. Las bandas de igual movilidad en los geles fueron consideradas idénticas. Para el análisis de similaridad se empleó el programa FREETREE v 0.9.1.50 y el método de agrupación UPGMA (Unweighted Paired Group Method with Arithmetic Averages), por sus siglas en inglés, que se basó en el coeficiente de similaridad de Nei and Li. Después de que el software calculó la matriz de similitud y se definió el método de agrupación (UPGMA), se realizó el remuestreo por el método de bootstrapping con 1000 repeticiones. El remuestreo consistió en ir eliminando variables, una a la vez, e ir reconstruyendo el árbol de agrupación, y en los árboles obtenidos se refleja el porcentaje de variación respecto a todas las variables consideradas. Después de obtener los resultados del remuestreo, el dendrograma se obtuvo con el programa TreeView. Para el caso de los AFLPs, los datos fueron codificados y analizados de la misma manera que los de ISSR.

#### 4.4.4 Interpretación del dendrograma generado con marcadores ISSR.

Al observar la agrupación (Figura 7) por similitud de los aislamientos de México identificados como *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* respecto a las razas 1, 2, 3, 4 y 5 de f. spp. *ciceris*, se encontró la conformación de tres grupos bien definidos. El primer grupo constituido por las razas 1, 2, 3, y 4 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* procedentes de USA, las cuales, presentaron entre sí un alto porcentaje de similitud.

Se esperaba que al menos uno de los aislamientos de México identificados como *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* fueran ubicados por similitud genética a alguna de las razas utilizadas como control. Sin embargo, ningún aislamiento de México mostró un porcentaje del 100 % para ubicarlo por similitud a alguna de las razas utilizadas como control. Aun así, en el segundo grupo, en el cual se ubicaron los aislamientos 58, 44 (B58, B44) del estado de Guanajuato y los aislamientos 34 y 36 (S34 y S36) del estado de Sinaloa, respectivamente agrupados con la raza cinco de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, la cual presentó un 57 de similitud a los aislamientos 34 y 36 de Sinaloa, en tanto que el aislamiento 44 de Guanajuato presentó un 53 % de similitud a dicha raza. De este grupo el más disimilar fue el aislamiento 58 (B58), pero permanece unido al grupo de la raza cinco. Con estos perfiles no se puede aseverar la presencia de la raza 5 proporcionada por USDA-USA, ni de ninguna otra raza de las sugeridas por investigaciones anteriores (Perales, 2000; Luna, 2002; Beltrán, 2003,); sin embargo es posible que se tenga alguna variante de la raza cinco en México o una raza distinta a las que usamos como control. Para determinar la posición patogénica de los aislamientos de México identificados como *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* es necesario someterlos a pruebas de patogenicidad con la colección completa de líneas diferenciadoras de razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* y con ello tener información más amplia de la evolución de síntomas en las plantas diferenciales y determinar su ubicación a la siguiente categoría (raza).

En el tercer grupo se ubicaron los aislamientos 48 y 60 del estado de Guanajuato y los aislamientos 35, 29, 30 y 46 del estado de Sinaloa, respectivamente. Los cuales a pesar de estar muy alejados de la raza 1, 2, 3, y 4 de f. spp. *ciceris* procedentes de USDA-USA, guardan cierto parentesco genético al grupo dónde se ubica la raza 5.

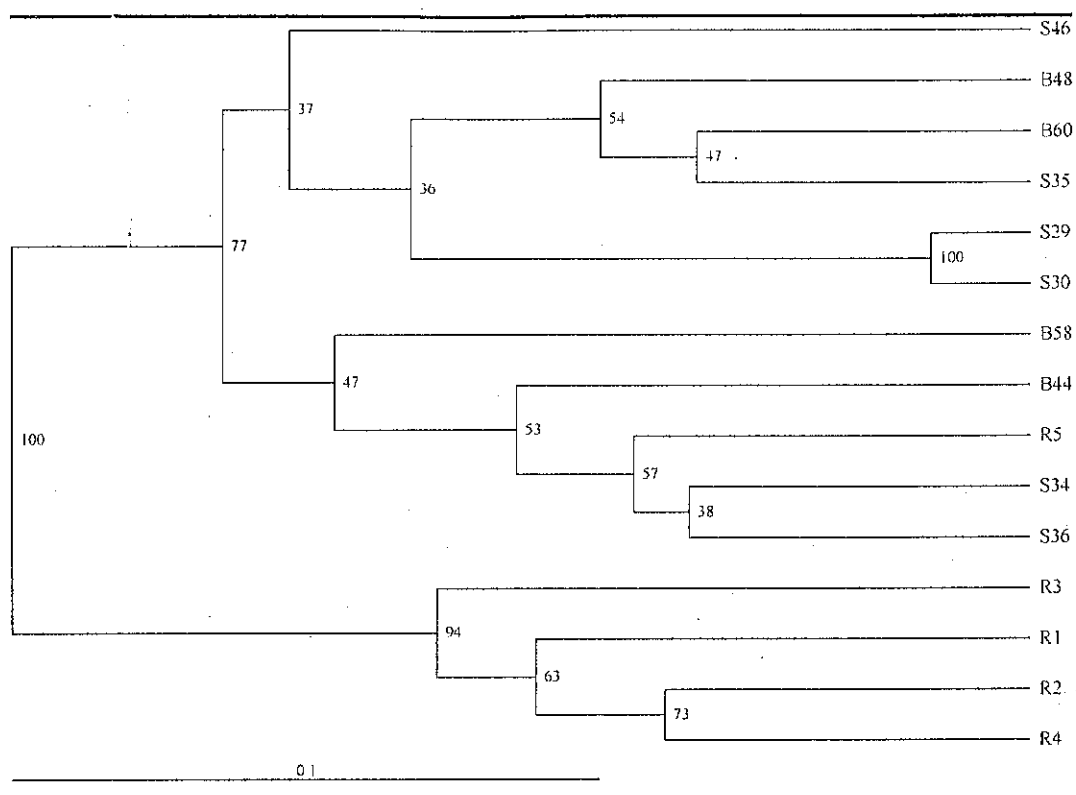


Figura 7. Agrupamiento de aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* de México respecto a las razas 1, 2, 3, 4 y 5 de f. spp. *ciceris* con cinco iniciadores de ISSR agrupados por el método de UPGMA y el coeficiente de similitud de Nei and Li

#### 4.4.5 Interpretación del dendrograma generado de los datos de AFLP

Al observar la agrupación (Figura 8), proporcionada por los datos AFLPs de los aislamientos de México que resultaron positivos a la identificación de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, se formaron dos grupos perfectamente bien definidos al ser comparados con las razas 1, 2, 3, 4, y 5 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* procedentes de USDA-USA. La primera agrupación con un 99 % de los remuestreos se encontró a las razas 1, 2, 3, y 4; agrupación que coincide con las obtenidas después de analizar los matriz de datos generados con los marcadores ISSR. Para el caso de la segunda agrupación, se ubicó la raza cinco, grupo en la cual se encuentran todos los aislamientos de México que resultaron positivos en la identificación de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*. Dentro de esta

respectivamente. Los aislamientos que se mantuvieron durante todo el remuestreo independiente a un subgrupo fueron los aislamientos 58, 34 y 35 respectivamente.

Aun cuando la agrupación fenética de los datos obtenidos de la codificación de fragmentos de AFLP no fue totalmente consistente respecto a que aquellos obtenidos por el análisis de fragmentos de ISSR, la información de la variabilidad genética entre las razas de este patógeno y los aislamientos de México que resultaron positivos a *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* fue suficiente para determinar que en entre los aislamientos de México existan razas distintas o variantes de las razas respecto a los controles positivos. Además, de que todos los aislamientos de México están más relacionados genéticamente a la raza cinco que a las razas 1, 2, 3 y 4 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*.

La utilidad y la aplicabilidad de esta información para fines de diseño y creación de estrategias de manejo fitosanitario del cultivo del garbanzo con respecto al control del hongo patogénico referido en este estudio, solo será posible si se continua con las pruebas de patogenicidad de los aislamientos de México sobre un conjunto más completo de líneas diferenciales de garbanzo, para determinar su ubicación a nivel de raza. La información que se obtendrá de este estudio es, en primera instancia ubicar los aislamientos a la raza a la cual pertenecen y a la vez, identificar líneas que presenten resistencia, a partir de las cuáles se pueden generar variedades resistentes a las razas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*.

#### **4.5 Comparación de secuencias del gene de factor de elongación y de la traducción 1 $\alpha$ (*EF1 $\alpha$* ) de aislamientos procedentes de Guanajuato y Michoacán**

Con la idea de ubicar taxonómicamente a 34 aislamientos de *Fusarium oxysporum* obtenidos de plantas de garbanzo enfermas colectadas en campos, sus secuencias génicas fueron editadas y alineadas con secuencias homólogas de aislamientos de otras formas especiales de *F. oxysporum* obtenidas de GenBank, mediante Bioedit 3.1. A cada aislamiento se le fue asignando el nombre con el cual sus secuencias *EF1 $\alpha$*  presentaron el mayor porcentaje de similitud a aquellos organismos reportados en esta base de datos

(Cuadro 36). En este caso, fueron cuatro aislamientos los que presentaron un 99 % de similitud a las secuencias *EF1 $\alpha$*  de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* que fueron el 44, 48, 58 y 60. Por los resultados obtenidos, esta herramienta es confiable en la identificación de patógenos mediante comparación de secuencias de regiones altamente conservadas, sin embargo, es relativamente caro pues se requiere de equipo más sofisticado. Además, se corre el riesgo de no encontrar parentesco con secuencias de los organismos reportadas en el GenBank.

Cuadro 36 Formas especiales de *Fusarium oxysporum* aisladas de plantas de garbanzo afectadas de marchitamiento y amarillamiento que presentaron mayor similitud con las secuencias *EF1 $\alpha$*  reportadas en el GenBank.

| Secuencia <i>EF1<math>\alpha</math></i> | AISLAMIENTO | % DE SEMEJANZA | NOMBRE                          |
|-----------------------------------------|-------------|----------------|---------------------------------|
| Sec.-EF                                 | 2           | 96             | <i>F. lactis</i>                |
| Sec.-EF                                 | 8           | 100            | <i>F. o. f. sp. batatas</i>     |
| Sec.-EF                                 | 9           | 100            | <i>F. o. f. sp. lycopersici</i> |
| Sec.-EF                                 | 10          | 100            | <i>F. o. f. sp. lycopersici</i> |
| Sec.-EF                                 | 14          | 99             | <i>F. equisetum</i>             |
| Sec.-EF                                 | 15          | 98             | <i>F. o. f. sp. spinocae</i>    |
| Sec.-EF                                 | 21          | 99             | <i>F. o. f. sp. lycopersici</i> |
| Sec.-EF                                 | 22          | 100            | <i>F. o. f. sp. cubense</i>     |
| Sec.-EF                                 | 23          | 99             | <i>F. o. f. sp. lycopersici</i> |
| Sec.-EF                                 | 25          | 99             | <i>F. proliferatum</i>          |
| Sec.-EF                                 | 26          | 99             | <i>F. o. f. sp. lycopersici</i> |
| Sec.-EF                                 | 31          | 98             | <i>F. o. f. sp. cucumerinum</i> |
| Sec.-EF                                 | 35          | 98             | <i>F. o. f. sp. cucumerinum</i> |
| Sec.-EF                                 | 37          | 99             | <i>F. o. f. sp. lycopersici</i> |
| Sec.-EF                                 | 38          | 98             | <i>F. o. f. sp. cucumerinum</i> |
| Sec.-EF                                 | 41          | 99             | <i>F. o. f. sp. opuntiarum</i>  |
| Sec.-EF                                 | 42          | 99             | <i>F. o. f. sp. lycopersici</i> |
| Sec.-EF                                 | 43          | 99             | <i>F. o. f. sp. lycopersici</i> |
| Sec.-EF                                 | 44          | 99             | <i>F. o. f. sp. spinocae</i>    |
| Sec.-EF                                 | 47          | 98             | <i>F. o. f. sp. opuntiarum</i>  |
| Sec.-EF                                 | 48          | 99             | <i>F. o. f. sp. ciceris</i>     |
| Sec.-EF                                 | 53          | 99             | <i>F. o. f. sp. opuntiarum</i>  |
| Sec.-EF                                 | 55          | 99             | <i>F. oxysporum</i>             |
| Sec.-EF                                 | 57          | 98             | <i>F. oxysporum</i>             |
| Sec.-EF                                 | 58          | 99             | <i>F. o. f. sp. ciceris</i>     |
| Sec.-EF                                 | 60          | 99             | <i>F. o. f. sp. ciceris</i>     |
| Sec.-EF                                 | 62          | 98             | <i>F. oxysporum</i>             |
| Sec.-EF                                 | 65          | 97             | <i>Netria ipomoeae</i>          |
| Sec.-EF                                 | 67          | 100            | <i>F. oxysporum</i>             |
| Sec.-EF                                 | 68          | 99             | <i>F. o. f. sp. opuntiarum</i>  |

|         |    |     |                        |
|---------|----|-----|------------------------|
| Sec.-EF | 69 | 97  | <i>Netria ipomoeae</i> |
| Sec.-EF | 71 | 98  | <i>F. oxysporum</i>    |
| Sec.-EF | 72 | 100 | <i>F. oxysporum</i>    |
| Sec.-EF | 74 | 100 | <i>F. oxysporum</i>    |

Para la prueba de patogenicidad, se seleccionaron aquellos aislamientos que presentaron el 99 a 100% de similitud con aquellos organismos reportados en el GenBank.

#### 4.6 Evaluación de la respuesta de las variedades Blanco Sinaloa 92 y JG-62 a las inoculaciones varias formas especiales de *Fusarium oxysporum* en invernadero

Después del transplante (22 de agosto de 2006), las observaciones se realizaron cada tercer día para evaluar la evolución de los síntomas de las plantas inoculadas con las distintas formas especiales. La variedad Blanco Sinaloa 92 presentó síntomas de amarillamiento a los 6 días después del transplante. Los síntomas de amarillamiento se iniciaron con una clorosis de los bordes de los folíolos de las hojas superiores, seguido de amarillamiento intenso y un secado progresivo de los folíolos, de las hojas hasta llegar al tallo de la planta. Después de la muerte de las hojas, estas permanecieron adheridas al tallo. En el caso de los tallos, al igual que las hojas también empezaron secarse de forma acrópeta, pero esto ocurrió después de secarse todas las hojas. A los 40 días después del transplante (10 de octubre de 2006), en suelo infestado (Cuadro 37) los aislamientos que causaron este tipo de síntomas fueron aquellos identificados por comparación de secuencias EF1 $\alpha$  como *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (23, 21, 55, 16), *F. oxysporum* f. sp. *opuntiarum* (41, 53), *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* (35) y *F. oxysporum* (62). Los aislamientos 30 y 36 que también se incluyeron en esta prueba y, que causaron el mismo nivel de daños sobre la variedad Blanco Sinaloa 92, simplemente se identificaron por características morfológicas como *F. oxysporum*.

A su vez, también los aislamientos identificados como *Fusarium oxysporum* f sp. *lycopersici* (42, 43 y 10) y *F. oxysporum cucumerinum* (31) causaron una reacción moderadamente susceptible en las plantas de garbanzo. Otros de los aislamientos que también causaron la misma reacción en las plantas de esta variedad, fueron aquellas

identificados por comparación de secuencias *EF1 $\alpha$*  como *Nectria ipomoeae* (65) y *F. oxysporum* f. sp. *spinoceae*.

A pesar de que estos aislamientos causaron la mortalidad de poco más de la mitad de poblaciones de plantas de la variedad Blanco Sinaloa 92 y más aun si consideramos que fueron cinco plantas de cada variedad por aislamiento, no se le puede asociar a ninguna raza de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* por no causar mayor daño en las plantas de la línea JG-62, la cual es susceptible a todas las razas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* excepto a la raza 0 de este patógeno. Poco mas del 90 % de estas plantas llegaron a la etapa productiva, las cuales solo presentaron amarillamiento en la hojas inferiores sin sufrir mas daños que la muerte de estas.

Estos resultados solo ponen de manifiesto la habilidad de este patógeno de atacar a o otros vegetales en ausencia de su hospedante (Baayen *et al.*, 2000), además si se considera que las plantas fueron extraídas y luego trasplantadas al suelo infestado, estos patógenos tuvieron la oportunidad de entrar en las posibles heridas ocasionadas a las raíces (Agrios, 1996)

Cuadro 37 Reacción de las variedades a la inoculación de varias formas especiales de *F. oxysporum*

| Variedad   | Aislamientos |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | DDT |
|------------|--------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|
|            | 23           | 53 | 30 | 41 | 21 | 55 | 36 | 16 | 35 | 42 | 43 | 31 | 65 | 15 | 22 | 10 | 62 |     |
| Bco Sin 92 | S            | S  | S  | S  | S  | S  | S  | S  | S  | M  | M  | M  | M  | M  | M  | M  | S  | 40  |
| JG-62      | M            | M  | M  | M  | M  | M  | M  | M  | M  | M  | M  | M  | M  | M  | M  | M  | M  |     |

DDT: Días después del transplante; S: 100% de mortalidad; M: Máximo 50% de follaje dañado.

#### 4.7 Evaluación de la respuesta de las variedades diferenciadoras de garbanzo a las inoculaciones *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*.

El transplante de las plantas diferenciales de garbanzo en suelo infestado con los aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* se terminó de realizar el 22 de agosto del 2006 en el invernadero de Parasitología de agrícola de la Universidad Autónoma

Chapingo. Se utilizaron cinco plantas por línea diferencial y cinco líneas diferenciales de garbanzo por aislamiento el cual se detalla en el cuadro 38.

Las plantas que murieron a los 4 días después del trasplante en suelo infestado, se consideraron como datos perdidos, ya que su muerte pudo haber sido por las heridas ocasionadas a las raíces durante el trasplante o por incapacidad de la planta de restablecerse. Las observaciones de la evolución de síntomas se realizaron cada tercer día. Para el cálculo de daño al follaje, la planta se dividió en tres niveles, si las hojas con clorosis se localizaron de la base a mas de la mitad de la planta, ésta se consideró como susceptible, en cambio si las hojas con clorosis se encontraron a un tercio de la base de las plantas esta se considero como resistente y exactamente a la mitad se consideró como medianamente susceptible.

La toma de datos generó una tabla de reacción de las variedades diferenciales de garbanzo después de ser trasplantados en suelos infestados con aislamientos identificados como *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*. De los cuatro aislamientos evaluados, los mas cercanos a ubicarlos a la raza cinco fueron el aislamiento 44 y 48. Las plantas de la línea JG-62 transplantadas en suelos infestados con estos aislamientos murieron a los 15 días. Los síntomas observados en estas plantas se caracterizaron por un desarrollo rápido de flacidez, seguida de la desecación de las hojas que se extendió al resto de la planta y muerte de la misma en ausencia de amarillamiento.

El resto de las plantas que en todos los tratamientos fueron calificados como moderadamente susceptibles o susceptibles, se caracterizaron por presentar una clorosis en el borde de los foliolos seguida de una necrosis y muerte de las hojas, sin embargo, éstas síntomas solo se presentaron en las hojas inferiores sin causar la mortalidad de las plantas ya que al finalizar al experimento (10 de Noviembre de 2006), llegaron a la etapa productiva.

Con estos resultados aunque se verificó la patogenicidad de los aislamientos 44 y 48 sobre la línea JG-62, los resultados no son suficientemente para determinar su posición

patogénica, ya que para determinar la razas de este patógeno, los investigadores que emplearon esta metodología han empleado al menos 10 variedades diferenciales (Haware y Nene 1982b; Cabrera de la colina *et al.*, 1986; Jiménez *et al.*, 1989a)

Cuadro 38 Reacción de las platas diferenciales al ser transplantadas en suelo infestado con *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*.

| VARIEDAD | Aislamiento de <i>F. oxysporum</i> f sp <i>ciceris</i> |    |    |    |
|----------|--------------------------------------------------------|----|----|----|
|          | 60                                                     | 44 | 48 | 58 |
| JG-62    | M                                                      | S  | S  | M  |
| JG-74    | M                                                      | M  | R  | R  |
| CPS-1    | S                                                      | M  | M  | S  |
| BG-212   | M                                                      | M  | R  | R  |
| WR-315   | R                                                      | R  | R  | R  |

## V. CONCLUSIONES

De 144 aislamientos de *Fusarium oxysporum* evaluados, únicamente 10 se identificaron como *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, de los cuales 4 ( B44, B46, B48 y B60) correspondieron al estado de Guanajuato y 6 (S29, S30, S34, S35, S36 y S46) al estado de Sinaloa.

De los aislamientos que se identificaron como *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* por la comparación de las secuencias *EF1 $\alpha$*  y posteriormente con primers de amplificación selectiva para *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* fueron el 44, 48, 58 y 60, respectivamente. De los cuales, los aislamientos 44 y 48 causaron marchitez y muerte de plantas de la línea JG-62 antes de cumplir los 20 días a partir del trasplante en suelo infestado, reacción de síntoma que coincidió con la reportada para la raza 5 para ésta línea diferencial en particular, pero no así para las otras líneas diferenciales.

Los aislamientos 58 y 60 que también resultaron positivos a *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* solo causaron amarillamiento en las líneas diferenciales sobre la cuales se evaluaron.

Mediante la agrupación fenética de los aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* generado del análisis de la matriz de datos obtenidos de la codificación de los fragmentos de ISSR y AFLP, ninguno de los aislamientos de México se ajustó por similitud a las razas 1, 2, 3, 4, y 5 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* que se emplearon como control.

Los diez aislamientos de México se ubicaron en el agrupación donde se localizó la raza cinco de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. Sin embargo, entre los aislamientos de México y la raza cinco hubo mucha variabilidad genética para determinar que alguno de ellos correspondía a la raza cinco.

De las diferentes formas spp de *Fusarium* que se evaluaron sobre las líneas JG-62 y Blanco Sinaloa 92, todas resultaron patogénicas sobre todo para ésta última variedad causando amarillamiento y muerte progresiva del follaje y descendente en la planta. En tanto que las la línea JG-62; susceptible a todas las razas de la f. spp *ciceris* se mostró de resistente a moderadamente resistente. Demostrándose la ausencia de alguna raza de este patógeno entre los aislamientos evaluados.

## VI. BIBLIOGRAFIA

- Agrios, G. N. 1996. Fitopatología. Ed. Limusa. 2 ed. Mexico. 838 p.
- Aguilar R, J. 2003. Uso de nuevas técnicas en la detección y análisis genético de fitopatógenos de importancia cuarentenaria. In: Memorias del evento de aprobación para signatario de laboratorio de diagnóstico fitosanitario; Tomo II: Base técnica. Chapingo, México.
- Ahmed, K. M. and C. Reddy. 1993. A pictorial guide to the identification of seedborne fungi of sorghum, pearlmillet, finger, chickpea, pigeonpea and groundnut. ICRISAT. India. 14 p.
- Andrade, A. E. 1989. Carretera-145 variedad de garbanzo porquero de riego para el Centro y Sur de Guanajuato. SARH-INIA. Celaya, México. 11p.
- Gómez G., R. M., M. K. Aviléz G. y J. J. Pérez V. 1989 El Cultivo del Garbanzo Blanco en el Centro de Sinaloa. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas y Pecuaria INIFAP. Folleto para Productores No. 41, 2da ed. Centro de Investigaciones Regional del Noroeste Campo Experimental Valle de Culiacán
- Anónimo, 2001. Estudio de Mercado para el Garbanzo. CR CONSULTORES AGRICOLAS, S.C.
- ASERCA. 1997. El garbanzo mexicano. Claridades agropecuarias 42:1-44. México D. F., México

- Baayen P. R., K. O'Donnell, P. J. M. Bonants, E. Cigelnik, L. P. N. M. Kroon, E. J. A. Roebroek, A. J., and C. Waalwijk. 2000. Gene genealogies and AFLP analysis in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic *formae speciales* causing wilt and rot disease. *Phytopathology* 90:891-900.
- Barreto B., P. 2001. Reacción de especies de garbanzo silvestre y líneas cultivadas a la inoculación con la raza tres y cuatro de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. Tesis Profesional. Universidad Autónoma Chapingo. México. 50 p.
- Bainbridge, B. W., B. C. L. Spreadbury, F. G. Scalice, and J. Cohen. 1990. Improved method for the preparation of high molecular weight DNA from large and small scale cultures of filamentous fungi. *Microbiology letter*. 66:113-118.
- Beltrán R, M. G. 2003. Caracterización de Aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* mediante proteínas y planas diferenciales. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México.
- Blancard D, H. Q. Lecoq and M. Pitrat. 1991. Enfermedades de las cucurbitáceas. Ed. Mundi Prensa. Madrid, España 301p.
- Booth, C. 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey. England. 237P
- Buddenhagen, I. W., and F. Workneh. 1988. *Fusarium* wilt of chickpea in California. (Abstract) *Phytopathology* 78: 1563.
- Cabrera de la Colina, J. 1986. Variación patogénica en *Fusarium oxysporum* Schlechtend. emend. Snyder & Hansen y *F. solani* (Mart.) Sacc. emend. Snyder & Hansen agentes de la Marchitez y Podredumbre de Raíz del garbanzo en Andalucía. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba. Córdoba, 237 p.

- Cabrera de la Colina, J, A Trapero C and R. M. Jiménez D. 1985. Races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* in Andalucía Southern Spain. International Chickpea Newsletter 13: 24-26.
- Coronel E., F. 1980. Sistemas de producción del cultivo de garbanzo en el área de influencia del CIAPAN. SARH. Folleto No. 2 Publicación Técnica CIAS. No. 2 Culiacán, Sinaloa. 74 p.
- Crispín M, A. y H. López G. 1976. El garbanzo: Un cultivo importante en México. Folleto de Divulgación No. 156. INIA-SARH. México. 30 p
- Cruz O., E. García y F. Carrillo. 1998. Enfermedades de las hortalizas. Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán de Rosales, Sinaloa, México. pp 19-29.
- De Miguel, G. E. 1991. El garbanzo. Una alternativa para el Secano. Ed. Mundi Prensa. Madrid.
- Duke, J. A. 1981. Handbook of legumes of world economic importance. Plenum press, New York.
- Echandi, E. 1970. Wilt of chickpeas or garbanzo beans (*Cicer arietinum*) incited by *Fusarium oxysporum*. Phytopathology 60: 1539.
- Erwin, D. C. 1958. *Fusarium lateritium* f. sp. *ciceris*. Incitant of *Fusarium* wilt of *Cicer arietinum*. Phytopathology 48:498.
- FAO. 2003. Production Year Book, Vol 57, FAO, Rome.
- Frisullo, S., F. Ciccarese, M Amenduni, and R Zamani H. 1989. Wilt of chickpea (*Cicer arietinum* L.) by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* Schlech. in southern Italy. Difesa delle Piante 12: 181-182.

- Geiser, D. M., M. del M. Jiménez G., S. Kang, I. Makalowska, N. Veeraraghavan, T. J. Ward, N. Zhang, G. A. Kuldau and K. O'Donnell. 2004. *Fusarium*-ID v. 1.0: A DNA Sequence database for identifying *Fusarium*. European Journal of Plant Pathology 110:473-479.
- Ghanekar, A. M., S. C. Sethi, B. L. Jalali and Y. L. Nene. 1990. ICCV6 (ICCC32) A kabuli chickpea resistant to *Fusarium* wilt and Root rots. International Chickpea Newsletter 23: 22-23.
- González, Ch y Simpson, J. 1997. Diversidad genética en hongos (origen y análisis) en Soriano, J. y Espinoza, A. (eds). Tópicos Selectos en Fitopatología: Genética Molecular. Sociedad Mexicana de Fitopatología A. C. CINVESTAV unidad Irapuato, México. pp37-38.
- Gumber, R. K., J. Kumar, and M. P. Haware. 1995. Inheritance of resistance to *Fusarium* wilt in chickpea. Plant Breeding 114: 277-279.
- Halila, H. M. and Harrabi, M. M. 1990. Breeding for dual resistance to Ascochyta and wilt diseases in chickpea. Options Mediterr. Ser. Semin. 9: 163-166.
- Halila, M. H. and Strange, R. N. 1996. Identification of the causal agent of wilt of chickpea in Tunisia as *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* race 0. Phytopathologia Mediterranea 35: 67-74.
- Haware, M. P. 1990. Fusarium wilt and other important diseases of chickpea in the Mediterranean area. Options Mediterr. Ser. Semin. 9: 61-64.
- Haware, M. P. 1998. Diseases of chickpea. In: Allen, D. J. and J. M. Lenne. The Pathology of food and pasture legumes. CAB International. U.K. 473-509.

- Haware, M. P., R. M. Jiménez D., K. S. Amin, J. C. Phillips and M. H. Halila. 1989. Integrated management of wilt and root rots of chickpea. Proceedings of the International Workshop of Chickpea in the Nineties, ICARDA/ICRISAT. Patancheru, A. P., India.
- Haware, M. P., Y. L. Nene and R. Rajeshwari. 1978. Erradication of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* transmitted in chickpea seed. Phytopathology 68: 1364-1367.
- Haware, M. P. and Y. L. Nene. 1982a. Symptomless carriers of the chickpea wilt *Fusarium*. Plant Disease 66: 250-251.
- Haware, M. P., and Y. L. Nene. 1982b. Races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. Plant Disease 66: 809-810.
- Helms, D., L. Panella, I. W. Buddenhagen, F. Workneh, C. L. Tucker, K. W. Foster and L. P. Gepts. 1992. Registration of 'UC 15' chickpea. Crops Sci. 32: 500.
- Herrera, T y M. Ulloa. 1998. El reino de los hongos. Micología básica aplicada. Ed. Fondo de cultura económica S. A. de C. V. México.
- Huisman, J. and F. B. Van der Poel A. 1994. Aspects of nutritional quality and use of cool season food legumes in animal feed. The Netherlands, pp 53-76.
- Jiménez D., R. M. 1994. La Fusariosis Vascular del garbanzo causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*: 15 años de Investigación en España. Investigación Agraria: Producción y Protección Vegetales. Fuera de Serie 2: 285-294.
- Jiménez D., R. M., A. Trapero C. and J. Cabrera de la Colina. 1989a. Races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* infecting chickpea in southern Spain. Vascular wilt

- diseases of plants. NATO ASI. Ser. Vol. H 28: 515-520. E. C. Tjamos y C. H. Beckman (eds.) Springer-Verlag, Berlin.
- Jiménez D., R. M., A. Trapero C. and I. Cubero. 1989b. Importance of chickpea soilborne diseases in the Mediterranean basin. Proceedings of the Consultancy Meeting on Breeding for Disease Resistance in kabuli Chickpeas. ICARDA, Aleppo, Siria.
- Jiménez D., R. M. and A. Trapero C. 1985. Use of fungicide treatments and host resistance to control the wilt and root rot complex of chickpeas. *Plant Disease* 69: 591-595.
- Jiménez G., M. M. 2001. Caracterización molecular de razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* y análisis de su diversidad genética. Tesis de doctorado. Universidad de Córdoba. Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC. Córdoba
- Jiménez D., R. M., A. R. Alcalá J., A. Hervás and J. L. Trapero C. 1993. Pathogenic variability and hosts resistance in the *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* / *Cicer arietinum* pathosystem. En: Proc. Eur. Semin. *Fusarium* Mycotoxins, Taxonomy, Pathogenicity and Host Resistance, 3rd (pp 87-94) Hodowska Ròslin Aklimatyazacja i Nasiennictwo. Plant Breeding and Acclimatization Institute, Radzików, Polonia. pp87-94
- Kannaiyan, J. 1981. Diseases of chickpea in Malai. *International Chickpea Newsletter* 4: 16.
- Kelly, A. G., B. W. Bainbridge, J. B. Heale, E. Pérez and R. M. Jiménez D. 1998. In planta-polymerase-chain-reaction detection of the wilt-inducing pathotype of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Physiological and Molecular Plant Pathology* 52: 397-409.

- Kendrick, B. 2000. The fifth kingdom. Third edition. Ed. Focus publishing. USA. 374p.
- Klots, L. V. Nelson. P. E., & Tousson, T. A. 1988. A medium for enhancement of clamydospore formation in *Fusarium* species. Mycologia.: pp.108-109
- Kumar, J., M. P. Haware and J. B. Smithson, 1985. Registration of four short duration *Fusarium* wilt-resistant kabuli (garbanzo) chickpea germplasm. Crop Science 25: 576-577.
- Kumar, J., and M. P. Haware. 1982. Inheritance to *Fusarium* wilt of chickpea. Phytopathology 72: 1035-1036.
- Ladisinky G. 1975. A New Cicer from Turkey. Notes of the Royal Botanic Garden Edinburg 34:201-202.
- Luna P, A. 2002. Variabilidad genética de cepas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* mediante RAPD-PCR en el Bajío, México. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México.
- Maclea, D. J., K. S. Braithte, J. M. Manners and J. A. G. Irwin. 1993. How do we identify and classify fungal plant pathogens the era of DNA analysis. Plant Pathology 10:207-244.
- Mateo H., M. 1996. El cultivo del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en México. Tesis Profesional. Universidad Autónoma Chapingo. México. 61 p.
- Morales G, J. A. 1986. Chickpea breeding program in Sonora. International Chickpea Newsletter 15: 11-12.

- Nelson, P., T. Toussoun and W. Marasas. 1983. *Fusarium* especies. An: illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press University Park and London. 47p
- Nene, Y. L. and M. P. Haware. 1980. Screening for chickpea resistance to wilt. Plant Disease 64: 379-380.
- Nene, Y. L. and M. V. Reddy. 1987. Chickpea diseases and their control. in: The Chickpea: 233-270. M. C. Saxena, y K. B. Singh, eds. CAB International. Wallingford, Oxon, U. K.
- Padwick, G. W. 1940. The genus *Fusarium*. III. A critical study of the fungus causing wilt of gram (*Cicer arietinum* L) and the related species of the subsection *Orthocera* with special relation to the variability of key characteristics. Indian Journal Agric. Sciences. 10:241.
- Perales R, 2000. Identificación de razas fisiológicas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cicris* (Padw) Matuo & Sato, mediante patrones electroforéticos de proteínas. Tesis de Licenciatura. Universidad Autonoma Chapingo. Chapingo, Mexico.
- Pérez, S. 2000. Métodos para estudios genéticos en poblaciones de hongos fitopatógenos. Revista Protección Vegetal 15:137-148 pp.
- Phillips, J. C. 1988. A distinct race of chickpea wilts in California. International Chickpea Newsletter 18: 19-21.
- Prasad, N. and G. W. Padwick. 1939. The genus *Fusarium* II. A species of *Fusarium* as a cause of wilt of gram grain (*Cicer arietinum* L.) Indian Journal Agric.Sciences 9:371.

- Rahman M. L., M. P. Haware, I. H. Mian and A. M. Akanda. 1998. Races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* causing chickpea wilt in Indian. Bangladesh Journal of Plant Pathology 14:33-36.
- Reddy, M. V., T. N. Raju, and N. Y. Nene. 1990. Evaluation of chickpea lines in the All Indian Coordinated Varietal Trials for wilt and root rots resistance. International Chickpea Newsletter 23:22.
- Robinson R., A. 1989. Manejo del hospedante en patosistemas agrícolas. Colegio de Postgraduados. Montecillos, Edo. de México.
- Romero C, S., 1993. Hongos Fitopatógenos. Universidad Autónoma Chapingo. Dirección del patronato universitario A. C., Chapingo, México. 341 p.
- SAGARPA. 2006. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural Pesca y Alimentación. Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria. Anuario Estadística de la Producción Agrícola (1999-2005).
- SIACON. Sistema de Información Agroalimentaria de Consulta. Base de Datos. 1980 a 2005.
- Singh, K. B., J. Kumar, J. B. Smithson and M. P. Haware. 1987b. Complementation between genes for resistance to race 1 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* in chickpea. Plant Pathology 36: 539-543.
- Singh, K. B. and K. B. Dahiya. 1973. Breeding for wilt resistance in chickpea. Symposium on wilt problems and breeding for wilt resistance in Bengal gram (Abstract): 13-14. Indian Agricultural Research Institute, Nueva Delhi, India.
- Skoovgaard, K., H. I. Nirenberg, K. O'Donnell, S. Rosendahl. 2001. Evolution of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* races inferred from multigene genealogies. Ecology and Population Biology

- Susseeelendra, D., Y. L. Nene and A. G. Ramachandra R. 1992. Races of *Fusarium oxysporum* causing wit in chickpea serological and electrophoretic variability.
- Taylor, J. W., J. D. Jacobson, and C. M. Fisher. 1999. The evolution of asexual fungi: reproduction, speciation and classification. Annual Review Phytopathology 37:197-246.
- Trapero C, A. 1983. La marchitez y podredumbre de la raíz del garbanzo en el Valle del Guadalquivir: Importancia, distribución, etiología, epidemiología y medios de lucha. Tesis Doctoral, Universidad de Córdoba, Córdoba, 295 pp.
- Trapero C, A. and R. M. Jiménez D. 1985. Fungal wilt and root rot diseases of chickpea in Southern Spain. Phytopathology 75: 1146-1151.
- Trapero C, A., y R. M. Jiménez D. 1986a. La seca del garbanzo en Andalucía. Comunicaciones Agrarias. Serie Protección Vegetal, No 4: 64
- Ustimenko, G. V. 1982. El cultivo de plantas tropicales y subtropicales. MIR. Moscú, Rusia. 429 p.
- Valadez M, E., G. Kahl, J. Ramser, B. Hüttel y A. Rubluo-Islas. 2001. Técnicas moleculares para la caracterización de genomas vegetales (garbanzo) y algunas aplicaciones potenciales.
- Valadez M., E. y G. Kahl. 2000. Huellas de DNA en genomas de plantas (Teoría y protocolos de laboratorio). Universidad Autónoma Chapingo. Ed. Mundi Prensa México S. A de C. V. México.
- Van der Maesen L.,J. G . 1987. *Cicer* L.: Origin, history and taxonomy of chickpea. In: Saxena MC, Singh KB (eds) The Chickpea. CAB International, Wallingford, Oxon, OX10 8DE, UK, 11-34 pp.

Wolfe, A. D. 2005. ISSR Techniques for Evolutionary Biology. *Methods In Enzymology*, 395:134-144.