

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

ETIOLOGIA DE ENFERMEDADES TRANSMITIDAS
POR SEMILLA EN TOMATE DE CÁSCARA
(*Physalis ixocarpa* Brot). EN EL ESTADO DE GUANAJUATO

T E S I S
QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS
EN PROTECCIÓN VEGETAL

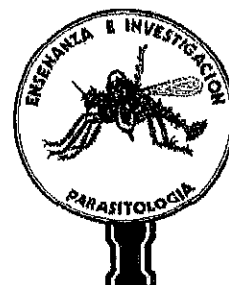


DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

PRESENTA:

JOSÉ LUIS CABALLERO CÁRDENAS

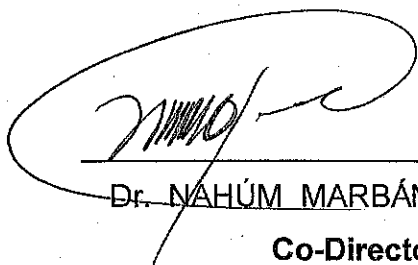
CHAPINGO, MÉXICO. DICIEMBRE DEL 2005



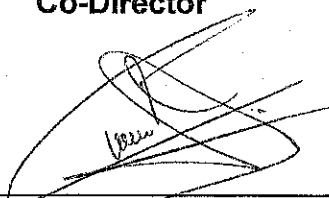
**ETIOLOGÍA DE ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR SEMILLA EN
TOMATE DE CÁSCARA (*Physalis ixocarpa* Brot) EN EL ESTADO DE
GUANAJUATO**

Tesis realizada por **José Luis Caballero Cárdenas**, bajo la dirección del
Comité Asesor indicado, aprobada y aceptada por el mismo como requisito
parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL



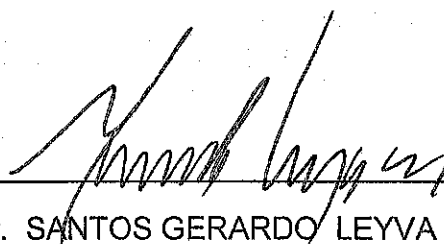
Dr. NAHÚM MARBÁN MENDOZA
Co-Director



M.C. BERTHA TLAPAL BOLAÑOS
Asesor



Dr. FELIPE DELGADILLO SÁNCHEZ
Asesor



Dr. SANTOS GERARDO LEYVA MIR
Asesor

AGRADECIMIENTOS

A DIOS por haberme permitido vivir todo este tiempo y poder cumplir esta meta que me propuse y culminarla.

Al CONSEJO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA (CONACYT) por la beca otorgada para realizar los cursos de maestría.

Al la UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO, en particular al Departamento de Parasitología Agrícola, por todas las facilidades brindadas durante mi estancia. Así como al Colegio de Postgraduados, en especial al Instituto de Fitosanidad por el apoyo brindado para la realización de este trabajo.

Al Dr. Cecilio Medoza Zamora († q.p.d.). por haberme recomendado trabajar con su esposa, una gran Fitopatóloga. A la M.C. Bertha Tlapal Bolaños por toda su paciencia, dedicación, consejos, charlas, enseñanzas y aportaciones en la elaboración de esta tesis. Al Dr. Felipe Delgadillo Sánchez, Dr. Nahúm Marbán Mendoza y Dr. Santos Gerardo Leyva Mir por su apoyo incondicional y acertadas enseñanzas en el presente trabajo.

Al laboratorista de virus Mario Salazar Segura y familia. Un reconocimiento muy especial por su gran, gran apoyo durante mi estancia en la Maestría, así como para la culminación de mi titulación, por haberme brindado no solo su casa sino su amistad, espero algún día corresponder de igual forma y muchas, muchas gracias que dios los bendiga siempre.

A los Matrimonios: Elsa Rodríguez y Rene, así como a Lourdes Cordero y Gaspar por habernos brindado un espacio en sus hogares, de antemano muchas gracias.

A mis compañeros y amigos de la Maestría en Protección Vegetal y amigos del IFIT del Colegio de Postgraduados.

Al United State Department of Agriculture (USDA), Animal Plant Health Inspection Service (APHIS), International Service (IS), in the Avocado Export Program por la oportunidad de trabajo y el tiempo permitido para titularme.

DEDICATORIA

A mi esposa

Ma. Guadalupe Almanza Serrano

Por ser una mujer maravillosa, que cambio mi vida por completo, por su apoyo, respeto, amor y sobretodo por su comprensión en todo momento.

A mis padres

*Maria Victoria Cárdenas Echevarria y José Luis Caballero
González*

A mis hermanos

*Juan Carlos, Aldo, Julian y s. e. Adriana, Anabel y s. e.
Alejandro (mi sobrina Alexa Sofia y la que viene encamino)*

Por ser siempre mi fuente de inspiración, cariño y amor porque siempre estaremos en las buenas y en las malas.

DATOS BIOGRÁFICOS

El presente autor es originario de un pueblo llamado Lic. Adolfo López Mateos más conocido como "LA JUNTA" y nació en Cd. Cuauhtémoc, Chihuahua el 12 de Enero de 1976. Estudió la primaria en su lugar de origen en la Escuela Primaria 12 de Octubre # 2368. La escuela secundaria la curso en la cabecera municipal en la Secundaria Técnica # 7 de Cd. Guerrero, Chih. Los estudios de Preparatoria los realizó en el Centro de Bachillerato Tecnológico Agropecuario (CBTa # 90) en la Cd. Cuauhtémoc, Chih. En 1994 ingresó a la Universidad Autónoma Chapingo y cursa el Propedeútico en la Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas (URUZA) después ingresó a la Carrera de Ingeniero Agrónomo Especialista en Fitotecnia de donde egresó en el año de 1999. En Enero de 2002 ingresa a la Maestría en Protección Vegetal y egresa en Diciembre del 2003. Ha trabajado en la formulación y evaluación de proyectos productivos en zonas marginadas del estado de Chihuahua. Y a mediados del 2004 ingresa al United State Department of Agriculture, Animal Plant Health Inspection Service, International Service, (USDA, APHIS, IS), in the Avocado Export Program donde actualmente se desempeña como inspector de campo y empaque.

CONTENIDO	Pags.
INDICE DE CUADROS.....	ix
INDICE DE FIGURAS.....	x
RESUMEN ABSTRACT.....	xiv
1.INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 OBJETIVOS.....	4
2. REVISIÓN DE BIBLIOGRAFÍA.....	5
2.1 Importancia del cultivo de tomate de cáscara (<i>Physalis</i> <i>ixocarpa</i> Brot) en México.....	5
2.2 Hongos transmitidos por semilla.....	7
2.3. Estudio de hongos del suelo en relación con hongos de las semillas.....	12
2.4 Efectos de los hongos en las semillas.....	12
2.4.1 Aborto de semilla.....	13
2.4.2 Reducción de tamaño de semilla (semilla chupada).....	13
2.4.3 Reducción de la producción de semilla.....	14
2.4.4 Pudrición de semilla.....	14
2.4.5 Esclerotización o estromatización.....	14
2.4.6 Deterioro de la semilla.....	15
2.5 Técnicas para la detección de hongos en semillas.....	15
2.5.1 Inspección directa.....	15
2.6 Métodos de incubación.....	16
2.6.1 Prueba de agar.....	15

2.6.2 Pruebas de papel secante.....	16
2.7 Virus relacionados con el tomate de cáscara.....	17
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
3.1 Muestreo.....	21
3.2 Colecta de semillas.....	21
3.3 Colecta de material vegetal.....	22
3.4 Desinfección de la semilla.....	22
3.5 Aislamiento y purificación.....	22
3.6 Purificación de las cepas de hongos.....	23
3.7 Incremento del inóculo.....	23
3.8 Esterilización del sustrato.....	23
3.9 Pruebas de patogenicidad.....	23
3.9.1 Patogenicidad <i>in vitro</i>	23
3.10 Identificación de los patógenos	25
3.10.1 Identificación de <i>Aspergillus</i> spp.....	25
3.10.2 Identificación de <i>Fusarium</i> spp.....	25
3.10.3 Identificación de <i>Mucor</i> spp.....	26
3.10.4 Identificación de <i>Penicillium</i> spp.....	26
3.10.5 Identificación de virus en semilla y en follaje.....	27
4. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	28
4.1 Aislamientos obtenidos de semilla.....	28
4.2 Distribución general de los hongos por localidad y género.....	29
4.3 Síntomas.....	32

4.4 Efecto de los hongos patógenos en la germinación y la emisión de radícula.....	37
4.5 Distribución de los hongos por cada localidad.....	42
4.6 Identificación de los hongos patógenicos.....	45
4.6.1 Identificación <i>Aspergillus spp</i>	45
4.7 Identificación a especie de los géneros de <i>Fusarium</i> encontrados.....	46
4.8 Identificación a especie del género <i>Mucor spp</i>	47
4. 9 Identificación a especie del género <i>Penicillium spp</i>	48
4. 10 Virus encontrados en follaje y semilla.....	53
5. CONCLUSIONES.....	54
6. LITERATURA CITADA.....	55
7. APENDICE.....	60

ÍNDICE DE CUADROS

Pags.

Cuadro 1. Número y porcentaje total de hongos aislados de las diferentes localidades de donde provenía la semilla.....	30
Cuadro 2. Incidencia progresiva de la germinación y área bajo la curva del progreso de la enfermedad en semillas de tomate de cáscara.....	36

Figura. 1. Aislamientos <i>in vitro</i> e identificaciones de géneros. a) semilla de donde se aislaron los hongos. b) crecimiento micelial amarillo de <i>Aspergillus</i> sp. c) crecimiento micelial violeta-púrpura de <i>Fusarium</i> sp. d) crecimiento micelial blanco de <i>Fusarium</i> sp. e) crecimiento micelial grisáceo de <i>Mucor</i> sp. f) crecimiento micelial verde seco de <i>Penicillium</i> sp. g) cabezuela mostrando la doble serie de esterigmas de <i>Aspergillus</i> sp. h) fialide corta y en forma de botella de <i>Fusarium</i> ⁽¹⁾ . i) fialides largas de <i>Fusarium</i> ⁽²⁾ . j) esporangióforo con protuberancias irregulares de <i>Mucor</i> sp. k) conidioforo en forma de escoba típico de <i>Penicillium</i> sp.....	31
--	----

Figura 2. Síntomas de los daños de en las semilla, a) colonización casi completa de <i>Aspergillus niger</i> sobre la semilla, b) colonización rápida de <i>M. plumbeus</i> , c) la colonización de <i>P. chrysogenum</i> fue menos densa que los demás hongo, aunque si se observan estructuras reproductivas del hongo sobre la semilla, d) la colonización de <i>Fusarium</i> spp fue una colonización completa, aunque no es todos los casos.....	34
---	----

Figura 3. Síntomas producidos <i>in vitro</i> por patógenos asilados de plantas de tomate de cáscara, k y l son los testigos sanos; a y b) inoculados con <i>Aspergillus</i> sp, el hongo rodeo totalmente a la semilla impidiendo la germinación, la coloración negrusca es la	
---	--

formación de estructuras sobre la semilla y el sustrato; c y d) inoculados con *Fusarium spp*⁽¹⁾ la semilla pudo germinar pero las plántulas fueron atacadas por el hongo (micelio blancuzco sobre el sustrato) causando una necrosis y muerte; e y f) inoculados con *Fusarium spp*⁽²⁾ este hongo causó la muerte de las plántulas, al invadirlas totalmente (micelio blanco-algodonoso); g y h) inoculadas con *Mucor* sp impidió la germinación de semillas (micelio blanco-grisáceo) y las que emergieron fueron también invadidas y atacadas hasta matarlas; i y j) inoculadas con *Penicillium* sp. mostró un micelio color verde, este hongo ataca cuando las plántula ya ha emergido, no llegando a matar a todas las plántulas..... 35

Figura. 4. Incidencia progresiva de la germinación de semillas de tomate de cáscara de los diferentes aislamientos patógenicos.....	47
Figura 5. Porcentaje de emisión de radícula y germinación por localidad.....	36
Figura 6. Porcentaje de emisión de radícula y germinación por género de hongo.....	37
Figura 7. Porcentaje de emisión de radícula y germinación por género de hongo y localidad.....	41
Figura 8. Porcentaje de emisión de radícula y germinación por género de hongos y localidad.....	42
Figura 9. Porcentaje de emisión de radícula y germinación por localidad	

y género de hongos.....	42
Figura 10. Porcentaje de emisión de radícula y germinación por localidad y género de hongos.....	44
Figura 11. Porcentaje de emisión de radícula y germinación por localidad y género de hongos.....	45
Figura 12. Características morfológicas de <i>Aspergillus niger</i> A) aa cabeza conidial (20X), aa' conidioforo liso (20X), B) bb Esterigmas en dos series (100X), bb' vesícula globosa (100X), C) cc conidios en cadena.....	49
Figura 13. <i>Fusarium oxysporum</i> . A y B) Macroconidios (100X), C) fialides cortas y en forma de botella (100X), D) presencia de clamidosporas y microconidios (100X), E) macroconidioforo ramificado lateralmente, F) macroconidioforo solitario (100X) y G) Colonia rosada con pigmentación violeta en PDA+pulpa de papa a los 10 días de edad (frente y anverso).....	50
Figura 14. <i>Fusarium solani</i> . A) Macroconidios de 3 y 4 células (100X), B) Microconidios de una y dos células (100X), C) Monofialides (100X), D) Clamidosporas solitarias (100X), E) Clamidosporas en par (100X), F) microconidios agrupados en falsas cabezas, formados en fialides largas (40X) y G) Colonia blanca con pigmentación crema en PDA + pulpa de papa a los 10 días de edad (reverso y frente).....	50
Figura 15. <i>Mucor plumbeus</i> . A y B) Esporangioforo ramificado (20X), C, D,	

E ,F) columnela con proyecciones irregulares, distintivo de la especie *M. plumbeus* (100X), G) esporangiosporas globosas, de color café palido, poco elipsoidales y de forma irregular (100X), H) esporangioforo hialino en las primeras etapas, constricto inmediatamente abajo del esporangio (100X), I) pared del esporangioforo distintivamente espinulada que se rompe cuando madura (100X), J) esporangioforo, columela y base sin rizoides característica que lo separa de *Rhizopus* sp (20X)..... 51

Figura 16. *Penicillium chrysogenum*. A) Estructura y características del conidióforo de *P. chrysogenum* (40X) B) pared del conidióforo lisa (100X), C) conidioforo cuartiverticidalo, es decir de cuatro divisiones entre cada unión (100X), D y E) Colonia crecida en Extracto de Levadura Agar (CYA), mostrando el anverso y reverso respectivo, así como pigmento soluble de color amarillo, F) crecimiento acanalado sobre el medio CYA; G y H) colonia crecida en Extracto de Malta Agar (MEA), mostrando reverso y anverso, I) crecimiento radial de color verde seco..... 52

Figura. 17 Síntomas de virosis en follaje de tomate de cáscara en el Bajío Guanajuatense..... 53

ETIOLOGÍA DE ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR SEMILLA EN TOMATE DE CÁSCARA (*Physalis ixocarpa* Brot) EN EL ESTADO DE GUANAJUATO.

ETIOLOGY OF SEED BORNE DISEASE IN HUSK TOMATO (*Physalis ixocarpa* Brot.) IN THE STATE OF GUANAJUATO

Caballero-Cárdenas, José Luis¹ y Marbán-Mendoza, Nahúm²

RESUMEN

Se analizó la semilla de tomate de cáscara proveniente de varias zonas productoras del estado de Guanajuato. Las cuales se realizaron en el 2002 y 2003. Se obtuvieron 105 aislamientos de hongos de los cuales al aplicar los postulados de Kosh se obtuvieron 83 aislados patogénicos de los siguientes géneros: *Aspergillus* sp, *Fusarium* sp¹, *Fusarium* sp², *Mucor* sp y *Penicillium* sp. Al realizar pruebas de germinación para esos hongos y evaluar el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPG), se obtuvo que todas las especies arriba mencionadas afectan la germinación en menor o mayor grado, dependiendo del hongo, las especies identificadas fueron. *M. plumbeus* afectando un 19 % de germinación, *A. niger* un 19.2 %, *F. solani* un 39.66 %, *F. oxysporum* un 41 %, *P. chrysogenum* un 50 % y el testigo un 85 % de germinación. En muestras de semilla y follaje se aplicó la prueba de ELISA para detectar virus y como resultado se encontraron positivas a los virus Cucumber Mosaic Virus (CMV) y Tobacco Mosaic Virus (TMV) respectivamente.

Palabras claves: *Physalis ixocarpa*, aislamientos, hongos, patogenicidad, virus.

SUMMARY

Husk tomato seeds from various production areas in the State of Guanajuato were analyzed. The seeds were collected in 2002 and 2003. Of the 105 fungi strains obtained, which were identified using the Koch Postulates, were obtained 83 pathogenic strains of the following genus were found: *Aspergillus* sp, *Fusarium* sp¹, *Fusarium* sp², *Mucor* sp y *Penicillium* sp. Upon applying germination test for these fungi and evaluating the area under the disease progressive curve (ABCPG), the genus get aforementioned species affected germination to a lesser or greater degree, depending on the fungi. The identify species were. *M.plumbeus* there was a germination rate of 19 %, with *A. niger* 19.2 %, with *F. solani* 39.66 %, with *F. oxysporum* 41 %, with *P. chrysogenum* 50 % and the control had a germination rate of 85 %. An ELISA test to detect viruses on the same was done and the viruses Cucumber Mosaic Virus (CMV) and Tobacco Mosaic Virus (TMV) respectively.

Key words: *Physalis ixocarpa*, strains, fungi, pathogenicity, virus.

¹ Tesista , Postgrado en Protección Vegetal. Universidad Autónoma Chapingo. Carr. México-Texcoco Km. 38.5 Chapingo, Edo. de México. C.P. 56230

² Profesor Investigador. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Carr. México-Texcoco Km. 38.5 Chapingo, Edo. de México. C.P. 56230

1. INTRODUCCIÓN

El tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot) es un cultivo tradicional desde tiempos precolombinos en México y Centro América, en donde sus frutos tienen una gran demanda para condimentar y suavizar la comida, utilizándose en la preparación de salsa, platillos típicos. (Peña y Márquez, 1990).

La superficie sembrada a nivel nacional de esta hortaliza fue de alrededor de 23, 579 ha distribuidas en los estados de Jalisco, Puebla, Morelos, Hidalgo, Michoacán y Guanajuato (SAGAR, 2000). En el estado de Guanajuato la superficie sembrada se divide en dos ciclos agrícolas Primavera-Verano y Otoño-Invierno, dedicándole más superficie en el ciclo Primavera-Verano.

Desde el año 1998 a la fecha la producción se ha disminuido notablemente en el estado de Guanajuato, quien ocupa el tercer lugar después de Jalisco y Michoacán. Los principales factores en un área menor de siembra han sido ocasionados por las enfermedades de tipo fungosa y viral (SAGAR, 2000).

La semilla como fuente de propagación del cultivo, sirve como transporte de diversos organismos que pueden ir dentro de la semilla o sobre ella. Los hongos que se transmiten por semilla sobreviven como esporas o estructuras de resistencia. Los que se alojan en el interior producen con frecuencia plantas infectadas. Sin embargo, los hongos que están sobre la semilla se consideran relativamente poco importantes en la dispersión de enfermedades (Neergard, 1977).

Entre las enfermedades del tipo fungoso se cita aquellas que atacan a las plántulas recién emergidas, raíces y el sistema vascular de plantas adultas ya que pueden ocasionar la pérdida total de la planta, sin que estas puedan llegar a dar frutos. Las plantas adultas que son atacadas por hongos en la raíz o el sistema vascular mueren; si estas habían producido frutos generalmente permanecen adheridos a ella, pero las semillas de esos frutos también son afectadas y al abrir los frutos se observa el desarrollo del micelio color blanco que cubre a las semillas (Mendoza, 1996).

Algunas semillas que logran conservar su viabilidad a pesar de haberse producido de frutos enfermos por hongos, son nuevamente utilizadas por agricultores en el siguiente ciclo y es probable que este inóculo produzca nuevas infecciones en plántula y durante el desarrollo del cultivo (Agrios, 1998).

El tomate de cáscara es atacado por varios agentes fitopatógenos. Las enfermedades virales representan un problema a nivel nacional tanto por el daño que causan al cultivo como por la dificultad en su manejo. Un solo cambio en un gen del hospedante o un solo punto de mutación en el virus puede provocar que una infección o sintomatología leve se tornen en una enfermedad severa; sin embargo una mayor alteración en el metabolismo del hospedante no necesariamente está determinada por una mayor actividad de replicación del virus (Matthews, 1992).

En cuanto a las enfermedades de tipo viral, en tomate de cáscara. De la Torre encontró, aisló y caracterizó los virus Tobacco Etch Virus (TEV), Cucumber Mosaic Virus (CMV), Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV), Impatiens Necrotic

Spot Virus (INSV), Tobbaco Ringspot Virus (TRV), Tobbaco Mosaic Virus (TMV), y Virus Cálico del tomate de cáscara (PhCaV) este último no estaba reportado en México. Todos encontrados en tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.) cultivado en los estados de México, Puebla y Morelos (De la Torre, 1996).

En este cultivo son pocos los estudios y la información que existe en México de los patógenos que atacan la semilla de tomate de cáscara y la importancia que estos tienen, por lo que se desarrolló el presente trabajo con los siguientes objetivos.

1.1 OBJETIVOS

- 1) Detectar e identificar la presencia de hongos fitopatógenos en semilla utilizada por los productores de tomate de cáscara para sus almácigos.
- 2) Detectar e identificar los virus involucrados en semilla y follaje en tomate de cáscara en zonas del Bajío Guanajuatense.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

La especie *Physalis ixocarapa* Brot es originaria de México, y desde épocas precolombinas los aztecas la cultivaban junto a sus milpas de maíz, aunque es muy probable que su cultivo fuese muy rudimentario, por lo que se cree que se desarrollaba en forma silvestre, siendo recolectado para ser consumido en salsa, acompañado con chile. Actualmente en algunas regiones de la costa del Pacífico y centro del país, donde subsisten sistemas tradicionales de producción que ni siquiera implican el uso de herbicidas, es común que los campesinos mexicanos recolecten el tomate de cáscara que crece en forma silvestre, para el consumo familiar e incluso para la venta, pues aún crece entre los maizales (Peña y Márquez, 1990).

2.1 Importancia del cultivo de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot) en México

El tomate de cáscara formó junto con el chile, jitomate, calabaza y camote, parte de la alimentación de los pobladores precolombinos. Se han encontrado vestigios de su uso como alimento en excavaciones hechas en el valle de Tehuacán, Puebla que datan de 900 a 200 años a. c. (Valdez, 1995, citado por Azorín, 1997).

En el contexto de las hortalizas de fruto, el tomate de cáscara, tomate verde ó tomatillo (*Physalis ixocarpa* Brot) es un cultivo de gran importancia en México, principalmente en la zona centro del país. El tomate de cáscara (*P. ixocarpa*,

Brot) es una especie originaria de México, esta era conocida por los aztecas desde épocas precolombinas, actualmente aun crece en forma silvestre a lo largo de la Costa de Pacífico desde California hasta Guatemala, lo llamaban miltomatl que quiere decir "tomate cultivado" encontrándose aun una gran cantidad de tipos silvestres y cultivados. (Peña y Márquez 1990). Se encuentra distribuido en la mayoría de los estados de México en forma silvestre, fomentada, cultivada y domesticada. Es una de las especies vegetales que actualmente han sido poco estudiadas. Sin embargo, para 1990 el tomate ocupaba el séptimo lugar con relación a superficie cultivada de esta hortaliza. En 1991 el cultivo se encontró, en 26 estados del país, destacando en los Estados de Puebla, Hidalgo, Guanajuato, Michoacán, Morelos, Jalisco y México, entre otros. En el periodo 1991 – 1992 los principales estados exportadores fueron Sinaloa y Tamaulipas (Santiaguillo, 1995).

A nivel nacional se cultivaron alrededor de 34,283 ha en 1993, con un rendimiento promedio de 12 ton/ha (SARH, 1993, citado por Santiaguillo *et al.*, 1996), para el año 2000, se sembraron 52,000 ha, siendo Sinaloa, Michoacán, Jalisco, México, Puebla, Sonora, Guanajuato e Hidalgo los principales estados productores (SAGAR, 2000).

Actualmente es utilizado por la industria de alimentos envasados para la fabricación de salsas verdes que pueden ser adquiridas en el supermercado, lo cual abre la posibilidad de aprovechar mejor los excedentes de producción en las épocas pico, lo que pudiera contribuir a regular las grandes fluctuaciones de

precios en función de las estaciones del año, redundando en beneficio tanto para el productor como para el consumidor (Peña y Márquez, 1990).

El cultivo de tomate de cáscara se ha incrementado por ser una hortaliza que no requiere muchos cuidados, debido al alto grado de rusticidad y por tener grandes perspectivas en el mercado, llegando incluso a ser producto sustituto del jitomate, cotizándose a buen precio y en ocasiones superiores al de éste; además, los rendimientos que se presentan son aceptables y su ciclo vegetativo es relativamente corto, razón por la cual ha cobrado gran importancia en México en las últimas dos décadas, aunque el rendimiento promedio nacional (alrededor de 12 ton/ha) sigue siendo bajo en relación con el potencial productivo del cultivo, que se estima en 40 ton/ha. (Santiaguillo, 1995) .

2.2 Hongos transmitidos por semilla

Los hongos son los patógenos más importantes de las plantas, y en cuanto a patógenos transmitidos por semillas también los son, así como las bacterias, nematodos, virus y viroides son acarreados en las semillas, no así los micoplasmas ni las rickettsias. Los hongos son organismos heterótrofos, es decir que no pueden sintetizar sus alimentos como las plantas y tienen que vivir como saprofitos en materia orgánica muerta, o bien como parásitos de otros organismos entre ellos las plantas de los que obtienen sus nutrientes (Agarwal y Sinclair, 1988). Así mismo el éxito de los hongos como fitopatógenos radica en varios hechos: producen un gran número de esporas, lo que significa una

elevada densidad de inóculo que es fácilmente dispersado por el viento, y el hombre a través de las transacciones de semillas infectadas..

Algunos hongos patógenos son llevados superficialmente en las semillas, mientras que otros se encuentran en el interior. Los hongos pueden penetrar a la semilla y depositarse en los tejidos del cotiledón. Rara vez se les encuentra en el embrión. La posición del patógeno en la superficie o dentro de la semilla puede afectar la supervivencia de esta una vez que se den condiciones adecuadas. Humedad y temperatura son condiciones favorables para mantener el vigor de la semilla, también protegen el periodo de vida del hongo patógeno. Bajo estas condiciones normales de almacenamiento, la longevidad de la mayoría de los hongos de la semilla se prolonga y así se asegura el inóculo una cosecha a otra (Moreno y Zamora, 1978).

La invasión de algunos hongos en las semillas puede ocurrir en el suelo después de la siembra y afectar las plántulas en el crecimiento causando pudriciones pre-emergentes y post-emergentes. Las semillas que tienen el pericarpio lesionado mecánicamente son invadidas con facilidad por los hongos, sobretodo durante la germinación (Olmedo, 1958).

Los hongos que afectan a las plantas en el campo, detienen su desarrollo en el momento en que las semillas alcanzan su madurez fisiológica y empiezan a perder agua; cuando están listas se cosechan. Cuando el contenido de humedad de la semilla es inferior al equilibrio con una humedad relativa al 90 %, estos hongos de campo entran en un estado de latencia, y así permanecen

durante el almacenamiento de las semillas, siendo activados por la humedad del suelo en el momento de la germinación de la misma (Richardson, 1979).

La pérdida de viabilidad de la semilla esta asociada con el desarrollo del hongo, aunque la relación no es del toda directa. En las primeras fases de la infección el crecimiento fungoso se desarrolla en las células muertas de la superficie, en las grietas y en las partes dañadas de la semilla. Se producen sustancias tóxicas que se difunden en el embrión y alteran su viabilidad. Un crecimiento vigoroso del hongo produce agua y aumenta la temperatura, acelerando así el deterioro fisiológico de la semilla pudiéndose difundir sustancias solubles al exterior para nutrir el hongo, en casos extremos la semilla puede incluso llegar a germinar (Richardson, 1979).

Algunos géneros como *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Alternaria* sp., *Fusarium* sp., *Cladosporium* sp., *Rhizopus* sp, presentan una distribución cosmopolita (Ramírez, 1984).

El tomate de cáscara como otros cultivos están sometidos a enfermedades, algunas de ellas pueden ser transmitidas por las semillas, si no son adecuadamente tratadas antes de la siembra. No siempre se realizan, lo que llega a provocar desastres en los cultivos que son obtenidos a partir de semillas contaminadas (Gil, 1991).

Numerosas enfermedades producidas por hongos, bacterias y virus pueden ser transmitidos por semillas. El agente patógeno puede estar situado en la cubierta seminal o en el embrión. En el primer caso, se dice que la contaminación es

externa y la semilla únicamente transporta el agente patógeno, mientras que en el segundo caso hay una verdadera transmisión (Gil, 1991).

Muchos hongos son parásitos serios de las semillas y reducen la producción de estas cuantitativa y cualitativamente. Otros hongos, incluyendo los saprofitos y parásitos débiles, pueden depreciar seriamente el valor comercial de estas (López, 1988).

Muchos de los hongos portados en las semillas no afectan inmediatamente la germinación. No matan a las semillas pero se multiplican en las plántulas emergentes, que pueden entonces sucumbir a la enfermedad. Algunos lotes de semillas que muestran en las pruebas una germinación elevada, son casi destruidos cuando se siembran en condiciones que favorecen el desarrollo de los organismos que lleva consigo (Vázquez, 1985).

La dispersión de una enfermedad dentro del campo resulta de una re-infección de las semillas. Esto se observa en numerosas plantas y en especial a aquellas con órganos como las vainas de leguminosas (Vázquez, 1985).

Según Raymond (1989) las principales enfermedades fungosas transmitidas por semilla en tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill) son: *Alternaria solani* (Ellis y Martín) Jones y Grout; *Cladosporium fulvum* Cooke; *Fusarium oxysporum* Sheldon; *Glomerella cingulata* Spauld y Schrenk; *Phoma destructiva* Plow; *Phytophthora nicotianae* Haanvar; *Rhizoctonia solani* Jun y *Verticillium dahliae*.

Según Warham, et al (1997), las formas de dispersión pueden constituir un mecanismo mediante el cual un agente patógeno puede ser introducido en una zona donde originalmente no existía.

Mridha y Siddique (1989) indicaron que los hongos que causan pudrición, no solo afectan sino que reducen la calidad de los frutos y que pueden transmitirse a través de la semilla.

Lara (2000), caracterizó e identificó a los hongos asociados a semilla de varias zonas productoras de chile del país. De todos los aislamientos solo el 9.7 % de los hongos fueron patogénicos a nivel de hoja y plántula. Los hongos que detectó en semilla fueron: *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium equiseti*, *Alternaria alternata* y *Rhizoctonia solani*, menciona también que estos hongos asociados a semilla de chile no afectan la germinación pero son patogénicos a nivel de hoja y plántula.

Vázquez (2003), en semillas de chile colectadas en tres localidades de estudio en los Valles Centrales de Oaxaca, identificó seis hongos en las siguientes proporciones: *Alternaria* spp (13.95 %), *Aspergillus* spp (62.64 %), *Fusarium* spp (0.93 %), *Penicillium* spp (41.67 %), *Rhizoctonia* sp (21.43 %) y *Trichoderma* sp (0.93 %).

González (2004), aisló varios patógenos de plantas de tomate de cáscara de varios municipios de Guanajuato, productores de esta hortaliza, después de probar la patogenicidad de esos aislamientos en plántulas de tomate de cáscara identificó a *Fusarium* sp, *Rhizoctonia* sp, *Sclerotium rolfsii* y *Trichoderma* sp, como causantes de ahogamiento, pudrición de la raíz y canchales.

2.3. Estudio de hongos del suelo en relación con hongos de las semillas

Christiansen and Kaufman (1965), trabajaron con hongos asociados a semillas clasificándolos dentro de dos grandes grupos "hongos de suelo" los cuales contaminan a las semillas en el campo durante la cosecha, y los "hongos de almacenamiento" los cuales contaminan a las semillas durante el transporte y almacenamiento. No podemos especificar cuando y como ocurre esa contaminación sobre las semillas, pero la mayor parte de estos hongos pueden vivir en ambas condiciones. Existen pocos hongos limitados a vivir en semillas, infectan y completan su ciclo de vida sobre o dentro de las mismas. Muchos organismos pueden ser introducidos al suelo a través de la siembra, sin embargo algunos organismos penetran, contaminan y colonizan tejidos de la planta en varias etapas del cultivo. Algunos de esos hongos influyen en la calidad de la semilla y reducen la capacidad germinativa de la misma. También producen sustancias tóxicas, como las aflatoxinas producidas por hongos toxicogénicos que afectan la salud de animales y humano.

2.4 Efectos de los hongos en las semillas

El impacto de los hongos sobre las semillas es muy considerable, muchos hongos son serios parásitos de semillas maduras e inmaduras reduciendo el rendimiento. Los hongos saprofitos y varios débiles causan reducción cualitativa a la semilla al provocarle decoloraciones lo que representa un problema serio en el valor comercial de la semilla. Algunos daños y desordenes se encuentran

a menudo en combinación y pueden causar problemas como: aborto de semillas, reducción del tamaño (semilla chupada), pudrición, esclerotización o estromatización, necrosis, decoloración, reducción o inhibición de la germinación y alteraciones fisiológicas en la semilla (Neergaard, 1977).

2.4.1 Aborto de semilla

Existen hongos que son capaces de provocar el aborto de semillas, principalmente en cereales y pastos cuando el hongo afecta en forma sistémica (como el ergot), en este caso los órganos florales son remplazados por la fructificación de los hongos parásitos. Ciertos hongos parásitos, son patógenos de flores y estructuras de la semilla, pero la pérdida de su patogenicidad ocurre cuando la semilla esta a punto de madurar. Los hongos pueden tener poca o ninguna preferencia algunos fitopatógenos causan deterioro en los óvulos y primordio de la semilla, lo que reduce cuantitativamente la producción de semilla (Neergaard, 1977).

2.4.2 Reducción de tamaño de semilla (semilla chupada)

Se da principalmente cuando existe la remoción de las semillas de los frutos cuando aún no alcanzan su madurez y se ve afectada de manera severa por hongos. (Neergaard, 1977).

2.4.3 Reducción de la producción de semilla

Es resultado del pobre desarrollo de la semilla causado por muchos hongos, los cuales no necesariamente son transmitidos por semilla. Los patógenos que atacan el follaje afectan directamente a la fotosíntesis lo cual es un factor adverso para el desarrollo de la semilla, un ejemplo importante es el ennegrecimiento de los tallos causado por la roya *Puccinia graminis* y otros cultivos como el mildiu *Peronospora destructor* en cebolla (Neergaard, 1977).

2.4.4 Pudrición de semilla

Varios de los hongos que afectan a la semilla ocasionan pudrición en las mismas, esto sucede durante la formación de la semilla en la planta y durante la germinación como por ejemplo tenemos a *Fusarium* sp en cereales incluyendo a *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. moniliforme* , *F. nivale* (Neergaard, 1977).

2.4.5 Esclerotización o estromatización

Es la transformación de órganos florales o de semillas en un esclerocio o en un estroma, es ciertamente una enfermedad importante de algunas categorías de hongos y hospedantes. El ergot producido por *Claviceps purpurea* y otras especies de *Claviceps* en cereales y pastos ejemplifican la esclerotización (Neergaard, 1977).

2.4.6 Deterioro de la semilla

Existen tres conceptos que caracterizan el deterioro de las semillas 1) el proceso de deterioro es inevitable, 2) el proceso del deterioro es irreversible y 3) el deterioro varía entre una población y otra de semilla. Estos puntos se ven reflejados directamente en la baja de germinación de la misma (McGee, 1998).

2.5 Técnicas para la detección de hongos en semillas

2.5.1 Inspección directa

Las semillas secas pueden ser examinadas para la presencia esclerocios y carbones mediante la ayuda del microscopio estereoscópico.

Las muestras pueden ser sumergidas en agua u otro líquido para provocar la esporulación del hongo, por ejemplo picnidios, o síntomas más visibles o para fomentar la liberación de las esporas. Después de la inmersión las semillas se examinan con un microscopio estereoscópico. Las semillas pueden sumergirse en agua conteniendo un agente que rompa la tensión superficial o en alcohol y sacudidas para remover las esporas del hongo o hifas, que están atacando o son acarreadas en la semilla. El exceso del líquido es removido y examinado utilizando un microscopio compuesto. Aunque los métodos de inspección de la semilla son utilizados para detectar la incidencia de hongos fácilmente visibles y estructuras, estos no inhiben la viabilidad del patógeno (Maude, 1996).

2.6 Métodos de incubación

2.6.1 Prueba de agar

Las pruebas de agar ofrecen una indicación de la variabilidad del inóculo presente en una muestra de semillas. Esto se logra poniendo semillas en PDA o Malta-Agar para favorecer el desarrollo. Los discos son incubados a 20 °C durante siete días para crear el desarrollo característico (micelio y estructuras reproductivas) del hongo. La luz cercana a la ultravioleta puede ser usada para favorecer el desarrollo de los cuerpos fructíferos (Limonard citado por Maude, 1996).

2.6.2 Pruebas de papel secante

Se utilizan 400 semillas (4 repeticiones de 100 semillas), se remojan las semillas durante 3 minutos en una solución de 10 % de hipoclorito de sodio y se enjuagan con agua destilada. Se colocan las semillas separadas por espacios uniformes sobre 2 o 4 capas de papel secante húmedo, dentro de una caja Petri, y se sella con parafilm, se incuba a 20 °C durante 10 días (12 h con luz blanca o cercana a la luz UV y 12 horas oscuridad). Las colonias fungosas son evaluadas al microscopio de disección y compuesto.

Estas pruebas y otras proporcionan condiciones excelentes para el desarrollo del micelio de muchos hongos; para la esporulación de conidios de varios hongos imperfectos y para la aparición de signos de infección producida por formas patógenas de estos hongos en las plántulas que germinan durante la incubación. No obstante, no se detectan con esta prueba muchos hongos

obligados transmitidos por semilla que no producen estructura vegetativas en las condiciones de las pruebas (Neergaard, 1977).

2.7 Virus relacionados con el tomate de cáscara.

Al tomate de cáscara le atacan un gran número de virus entre los que destaca el chino del tomate, que es ocasionado por un conjunto de virus, principalmente por el Tobacco Mosaic Virus (TMV), Tobacco Etch Virus (TEV), Tomato Spotted Wild Virus (TSWV) y Cucumber Mosaic Virus (CMV). Estos encontrados asociados en plantas con síntomas del chino (De la Torre, 1996). El cual es uno de los principales problemas en la producción de tomate de cáscara.

El TMV se transmite en alto porcentaje por semilla y fácilmente por métodos mecánicos, aunque no se ha identificado a algún organismo vector responsable de su transmisión. Inverna en tallos y hojas de tabacos ya sea en campo, cigarrillos u otros derivados (Agrios, 2001).

El número total de virus que se conocen hasta la fecha es de 2000 y cada mes se identifican a otros nuevos. Cerca de una cuarta parte de todos los virus conocidos atacan y producen enfermedades en las plantas (Agrios, 2001).

En México se han detectado y descrito diversos virus en cultivos como frijol, maíz, trigo, cebada, tomate, chile, tomate de cáscara, papa, papaya, pepino, melón y sandía. En el tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.), tanto en México, Centro América y Sur de Estados Unidos, es común encontrar plantas enfermas. Los síntomas más comunes son mosaicos de ligeros a severos, deformación o reducción de la lamina foliar, moteados amarillos y cálico, sobre-

deformación o reducción de la lamina foliar, moteados amarillos y cálico, sobrebrotación foliar, con reducción del tamaño de hojas y entrenudos, que ocasionan enanismo de las plantas, epinástia media de hojas y diversos tipos de amarillamiento. A estos síntomas se les atribuye un probable origen viral. En inoculaciones artificiales las distintas especies de *Physalis* sp son susceptibles a cerca de 60 virus diferentes, por lo que la posibilidad de que en este cultivo se encuentren virus conocidos y otros aun no identificados en México (De la Torre, 1996).

Para el diagnostico de enfermedades virosas se puede recurrir a las plantas indicadoras, inclusiones celulares, microcopia electrónica, transmisión por insectos vectores, serología y al análisis de ácidos nucleicos virales. La detección o prueba serológica de las plantas infectadas permite la detección de más de un virus, aunque de esta manera solo se detectan a los virus serológicamente específicos y por lo que uno o varios pueden pasar inadvertidos. (De la Torre, 1995).

La transmisión por semilla de los virus es poco estudiada, ya que la mayoría de las publicaciones hechas están basadas en análisis foliar para detectar la presencia de los virus (De la Torre, 1995).

Los virus que están dentro de la semilla pueden perder su infectividad aun en menos que la viabilidad de la semilla. Uno de los virus que más dura en la semilla es el Squash Mosaic Virus (SqMV) que oscila más o menos por 3 años en el almacenaje. La razón por la cual la transmisión por semilla no es muy abundante estriba en algunos casos en que el virus entra al embrión y este

alcanza su madurez, el virus se inactiva y en otros casos no entra al embrión ó también porque no hay conexiones del floema entre la planta y la semilla en desarrollo; o bien porque falta conexiones de plasmodesmos, cuando la semilla esta en desarrollo, sin embargo esto se ha debilitado porque en tejido de callo de tabaco, si se puede transmitir el virus de célula a célula sin existir conexiones plasmodesmales (Pinto, 1993).

La transmisión por semilla es importante porque se convierte en una fuente de inoculo primario, distribuido al azar de donde los vectores como el hombre se encargan de diseminarlo. El virus puede ir en la testa de la semilla como el TMV ó en el embrión. La transmisión se puede realizar a través del ovario o del polen, el virus penetra a la semilla antes de la diferenciación de las microsporas, cuando todavía no se forma la capa callosa. El porcentaje de transmisión varia de 1-100 dependiendo del virus y variantes, época de infección, temperatura, edad de la semilla (Pinto, 1993).

Se conoce como regla general que solo una pequeña cantidad (1-30 %) de las semillas que provienen de plantas infectadas por un virus lo transmiten, de ahí que la frecuencia de transmisión varié según la relación que se establezca entre el virus y su hospedante. En unos cuantos casos, como por ejemplo en la soya, el virus puede ser transmitido por casi el 100 % de las semilla de las plantas infectadas, mientras que en otros, la transmisión puede ser entre el 28 y 94 % como en el virus del mosaico de la calabaza en el melón y del 50 al 100 % en el virus mosaico de la cebada. Sin embargo, incluso dentro de una misma especie, las diferentes variedades o plantas inoculadas en distintas etapas de

su desarrollo pueden variar en los porcentajes de sus semillas que se transmiten por virus (Agrios, 2001).

Cook en 1947 aseveró que pocos virus son transmitidos a través de semillas de muchas especies de plantas. Sin embargo, la fundamentación de esta aseveración es débil, ya que Bennet en 1969 reportó 53 virus transmisibles por semilla y Phatak citado por Bennet, menciona alrededor de 85 virus transmisibles por semilla comerciable. En 1979 Neergard citó a más de 80 virus que son transmitidos por semilla. Bos en 1983 mencionó que alrededor de 100 virus conocidos que pueden portarse en la semilla y algunos tienen una alta proporción de transmisión de semillas de plantas madres infectadas, además, cita que cada semilla infectada puede producir una nueva fuente de infección en la próxima estación o en otro sitio. Manners en 1986 mencionó que aproximadamente 40 virus pueden ser transmitidos por semilla. Lange en 1986 mencionó que epidemiológicamente la transmisión de virus por semilla es muy eficiente para su distribución y que la infección puede ser establecida desde las primeras etapas de desarrollo en la planta; también menciona que las enfermedades virales pueden diseminarse a través de muestras de semilla infectada cubriendo grandes distancias para ser introducidas a nuevas áreas libres de la enfermedad.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de hongos fitopatógenos de hortalizas del Colegio de Postgraduados, así como en el laboratorio de virología del Departamento de Parasitología Agrícola, de la Universidad Autónoma Chapingo.

3.1 Muestreo

Los lugares de muestreo para el follaje fueron los municipios de Apaseo el Grande, Juventino Rosas, Salamanca, y Celaya, Guanajuato, así como un vivero ubicado en la carretera Celaya- Querétaro dedicado a la maquila de plántula y otro vivero ubicado entre Salamanca y Juventino Rosas.

3.2 Colecta de semillas

Las semillas fueron obtenidas de los productores de tomate de cáscara en dos invernaderos dedicados a la producción de plántula durante el mes de Septiembre del 2002, esta fue la primer colecta, la segunda se realizó en el mes de Marzo del 2003.

La semilla fue proporcionada por los maquiladores de plántula y solo un productor del municipio de Juventino Rosas, aquí cabe mencionar que la gran mayoría de los productores producen su propia semilla y comúnmente llevan las cimientes a los lugares donde producen la plántula. El método de extracción es empírico así como el proceso de selección, tamizado, secado y almacenado, cabe mencionar que al momento de la siembra en almacigo la semilla no lleva

ningún tratamiento químico de protección, excepto aquellos con mas recurso económico, que sí lo pueden realizar.

3.3 Colecta de material vegetal

Para la detección del virus en follaje se tomaron dos muestras de material vegetal, la primera una semana antes de floración y la segunda una semana después de la floración. La técnica de muestreo que se siguió fue en "cinco de oros" cinco surcos de 10 m de largo.

3.4 Desinfección de la semilla

Para la desinfección de la semilla se preparo hipoclorito de sodio al 1%.

Se tomaron 400 semillas de tomate de cáscara al azar de la muestra de cada productor (Neergaard, 1977). Las cuales se desinfectaron previamente con hipoclorito al 1% por 90 segundos, transcurrido el tiempo se enjuagaron con agua destilada estéril en dos pasos, se secaron perfectamente sobre papel filtro estéril, se colocaron sobre el medio de cultivo PDA pobre.

3.5 Aislamiento y purificación

En cajas de Petri se colocaron 10 semillas/caja con medio de cultivo PDA pobre, distribuyéndose espacialmente en toda la caja, se etiquetó la caja y se dejo crecer a temperatura ambiental por tiempo indefinido, hasta que se observó crecimiento miceliar. Las colonias que se presentaron en la semilla se aislaron en medio de cultivo PDA para su crecimiento tan pronto como se observo crecimiento miceliar de los alrededores de la semilla.

3.6 Purificación de las cepas de hongos

Del crecimiento que se obtuvo en PDA se transfirió a medio de cultivo Agua-Agar para que las hifas crecieran separadas y con la ayuda del microscopio estereoscópico se ubicaron cuatro puntas de hifa, estas se cortaron con el bisturí, se extrajeron y se colocaron en cajas de Petri con PDA.

3.7 Incremento del inóculo

Una vez que el hongo creció se procedió a incrementarlo en cajas de petri con PDA, a fin de obtener cinco repeticiones del hongo para la prueba de patogenicidad.

3.8 Esterilización del sustrato

Se utilizó como sustrato arena tamizada, que fue pasteurizada en frascos de vidrio por dos periodos de cuatro horas cada uno a 15 lb. de presión y 120 °C.

3.9 Pruebas de patogenicidad

3.9.1 Patogenicidad in vitro

A los hongos purificados se les determinó la patogenicidad de la siguiente forma.

Cada uno de los aislamientos se cultivo sobre PDA por cinco días, se cubrió con una capa de arena estéril sobre el PDA a manera de sustrato. Se agregó humedad al sustrato con agua destilada estéril. Las cajas fueron colocadas en una mesa de trabajo por un periodo de 10 días a temperatura ambiente. Para

cada asilamiento se colocaron veinte semillas por caja más el testigo sin hongo. Se evaluó la incidencia de la germinación, la cual se determino contando el número de plántulas que germinaron del total que se sembró. Los registros se tomaron cada día hasta el día diez de haber sembrado. También se registró el número de semillas que emitieron la radícula.

Para el cálculo de la incidencia se utilizó la siguiente ecuación:

$$I_i = \frac{\sum n_i}{N_i} \dots \text{Ecuación 1}$$

Donde;

I_i = incidencia de la germinación en el momento i ;

n_i = número de semillas germinadas en el momento i ;

N_i = número total de semillas al momento i . las evaluaciones se hicieron cada día durante diez días continuos.

Con los datos de incidencia se estimo el área bajo la curva del progreso de la germinación (ABCPG) para cada uno de los hongos. El ABCPG se estimó mediante el uso del software Statistical Analysis System (S.A.S.) versión 8.0.

Las estimaciones se hicieron de acuerdo a la ecuación siguiente:

$$ABCPE = \sum \left[\left(\frac{y_{t+1} + y_i}{2} \right) (t_{t+1} - t_i) \right] \dots \text{Ecuación 2}$$

Donde :

I : incidencia de mediciones;

t_{t+1} = tiempo "x" donde se realiza una medición (incidencia);

t_i = tiempo inmediatamente anterior al tiempo "x".

y_{t+1} = incidencia en el tiempo "x";

y_i = incidencia en el tiempo inmediatamente anterior al tiempo "x";

Las unidades del ABCPG se expresaron como proporción días. Los datos del ABCPG de cada tratamiento se estandarizaron mediante la estimación del área bajo la curva del progreso de la germinación absoluta, dividiendo el ABCPG entre la duración real de la enfermedad (Campbell y Madden, 1990).

3.10 Identificación de los patógenos

3.10.1 Identificación de *Aspergillus* spp

Para la identificación de aislamientos de *Aspergillus* sp se siguió la metodología de Thom & Raper (1945) y Watanabe (2002) Tomando en cuenta la característica de color de la colonia, forma y tamaño de conidioforo, acomodo de las series de los esterigmas así como el tamaño de los conidios. Utilizando como medios de cultivo PDA y Czapeck-Agar (Apéndice).

3.10.2 Identificación de *Fusarium* spp

Para la identificación de los aislamientos de *Fusarium* se siguió la metodología de Burgess *et al* 1994, tomando en cuenta la características de macroconidios, microconidios y clamidosporas. Las observaciones de los macroconidios se hicieron con 1000 aumentos para observar la forma de las células basales y del ápice. Para las características de color se siguió la metodología que indica Nelson *et al* (1983), los tubos con PDA se sembraron e incubaron por 12 días, bajo luz blanca a 25 °C día / 20 °C noche y con 12 horas de fotoperiodo, y se compararon con las laminas que muestra el autor.

3.10.3 Identificación de *Mucor* spp

Para la identificación del aislamiento de *Mucor* sp. se siguió la metodología de Domsch and Gans (1980), y Watanabe (2002). Se consideró la coloración de la colonia, tamaño y forma del esporangioforo, esporangio, columela y conidios, así como la ausencia de rizoides sobre la base del esporangioforo. Utilizando como medios de cultivo PDA y MEA (Apéndice).

3.10.4 Identificación de *Penicillium* spp

Las cepas se identificaron de acuerdo con a las claves taxonómicas de Pitt (1988), los aislados se crecieron en tres medios sólidos. Los medios que se probaron fueron Czapeck-Extracto de Levadura-Agar (de la siglas en ingles CYA), Extracto de Malta-agar (de las siglas en ingles MEA) y 25 % Glicerol-Nitrato-Agar (de las siglas en ingles G25N) (apéndice). Las temperaturas de incubación fueron de $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5$.

Inoculación del medio sólido. Una muestra de esporas de cultivos en PDA de cuatro días de crecimiento se tomo con la punta de una aguja y se deposito sobre el medio sólido CYA, MEA el número de puntos de inoculación del medio vario dependiendo del medio a siembra. Los cultivos se incubaron en bolsas de polietileno cerradas para prevenir evaporación y secado del medio. Después de siete días de incubación se registro la germinación o crecimiento microscópico, el diámetro de colonia en mm, y las características de la colonia.

La germinación o crecimiento se determino en cultivos a 37°C . y se observó a simple vista. El diámetro se registró con un vernier por el reverso de la caja;

esta variable se registró solo en aquellas colonias que presentaron radios regulares. El registro de las características color y textura de la colonia, extensión de esporulación y arreglo de cadenas conidiales, se realizó bajo un microscopio esteroescópico (American Optical Microstar) a 45 aumentos. Las preparaciones para observaciones al microscopio compuesto se hicieron de cultivos de 7 días de crecimiento en CYA y MEA. Con una aguja se tomo del margen de la colonia una porción del crecimiento del hongo y se colocó en una gota de alcohol puesta en un portaobjetos. Las estructuras del hongo se separaron con la ayuda de dos agujas para su mejor observación al microscopio. Cuando el alcohol se evaporó se agregó glicerol o glicerol con azul de metilo, se cubrió con un cubreobjetos y se selló con esmalte para uñas. La longitud y tamaño de las estructuras rami, metula, fiálide y conidios se determinaron bajo microscopio compuesto a 1000 aumentos.

3.10.5 Identificación de virus en semilla y en follaje

Para la detección de virus en semilla y follaje se utilizó la técnica serológica de ELISA. Donde se utilizó un gramo de semilla y tejido, colocando el macerado en celdas diferentes. Los antisueros (Anti -IgG) contra los que se probaron fueron TEV, TRSV, TMV, TSWV, AMV, CMV, 3F7 (Geminivirus).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Aislamientos obtenidos de semilla

De las localidades en estudio, Apaseo el Grande, Juventino Rosas, Maravatio, Morelos, Querétaro, Salamanca y Toluca, se obtuvieron 105 aislamientos. De la semilla colectada se identificaron cuatro géneros de hongos: (Fig 1). *Penicillium* sp. (63.81 %), *Aspergillus* sp (29.52 %), *Fusarium* sp (4.76 %) y *Mucor* sp (1.91 %) cuadro 1.

En el Cuadro 1 se puede observar la distribución de cada hongo de acuerdo al origen de la semilla, es importante resaltar que la semilla proveniente de Salamanca fue la que presentó el mayor número de aislamientos y diversidad de géneros, la mayoría correspondieron al género *Penicillium* spp, ya que se obtuvieron 51 que representaron el 61.45 % del total (aproximadamente poco más de la mitad de todos los aislamientos encontrados), lo que nos indica la presencia de inóculo primario disponible por cada aislamiento en dicha localidad. *Penicillium* spp prácticamente está presente en todos los lugares de origen de la semilla, seguido por el género *Aspergillus* spp con 26 aislamientos que corresponde al 31.32 % del total, éste no se presentó en la semilla proveniente de Toluca. El resto de los géneros se distribuyeron de manera errática y con pocos ejemplares en las diferentes localidades.

Este hecho no es raro o aislado para el caso de *Penicillium spp* y *Aspergillus spp* ya que estos géneros son cosmopolitas y con origen en el suelo como lo menciona Pitt (1988), quien afirma que *Penicillium spp* es un hongo omnipresente entre las más comunes formas de vida eucarióticas y de muy amplio rango de hábitats. Ramírez (1984) reportó a los géneros *Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.*, *Alternaria sp.*, *Fusarium sp.*, *Cladosporium sp.* y *Rhizopus sp.*; en diferentes partes del mundo, como organismos cosmopolitas.

La mayoría de los productores una vez que terminan de cosechar dejan los restos del cultivo en el campo lo que sirve como fuente de inóculo, ya que varias de sus estructuras permanecen en el suelo y otras se van a los frutos y semillas como lo reportó Mendoza (1996).

4.2 Pruebas de patogenicidad *in vitro*

La patogenicidad *in vitro* fue evaluada a través de la incidencia de la germinación, variable que sirvió para calcular el Área Bajo la Curva del Progreso de la Germinación absoluta (ABCPGa), la incidencia de germinación indirectamente probó la patogenicidad, es decir cuantas semillas germinaban por día, hasta terminar la evaluación. Cuando se obtuvo un valor alto de (ABCPGa) significó que el hongo a evaluar tuvo poco o nulo efecto directo sobre la germinación y con valores bajos significó que el o los hongos en estudio tuvieron un efecto directo sobre la germinación (Cuadro 2).

Cuadro 1. Número y porcentaje total de hongos aislados de las diferentes localidades de donde provenía la semilla.

Género	Apaseo el Grande ^c	Juventino Rosas	Maravatio	Morelos	Querétaro	Salamanca	Toluca
2003 ^a % AS ^b							
<i>Aspergillus pp</i>	1 0.95	2 1.90	3 2.85	9 8.57	2 1.90	13 12.38	- -
<i>Penicillium spp</i>	10 9.52	21 20.00	10 9.52	6 5.71	2 1.90	15 14.28	4 3.80
<i>Fusarium spp</i> ⁽¹⁾	- -	1 0.95	- -	- -	- -	1 0.95	- -
<i>Fusarium spp</i> ⁽²⁾	- -	- -	- -	1 0.95	- -	- -	2 1.90
<i>Mucor spp</i>	1 0.95	- -	- -	- -	- -	- -	1 0.95
TAL^d	12 11.42	22.85	13 12.38	16 15.23	4 3.80	29 27.61	7 6.65

^a año del muestreo

^b % del aislamiento

^c localidad de donde proviene la semilla

^d numero total del aislamiento por localidad

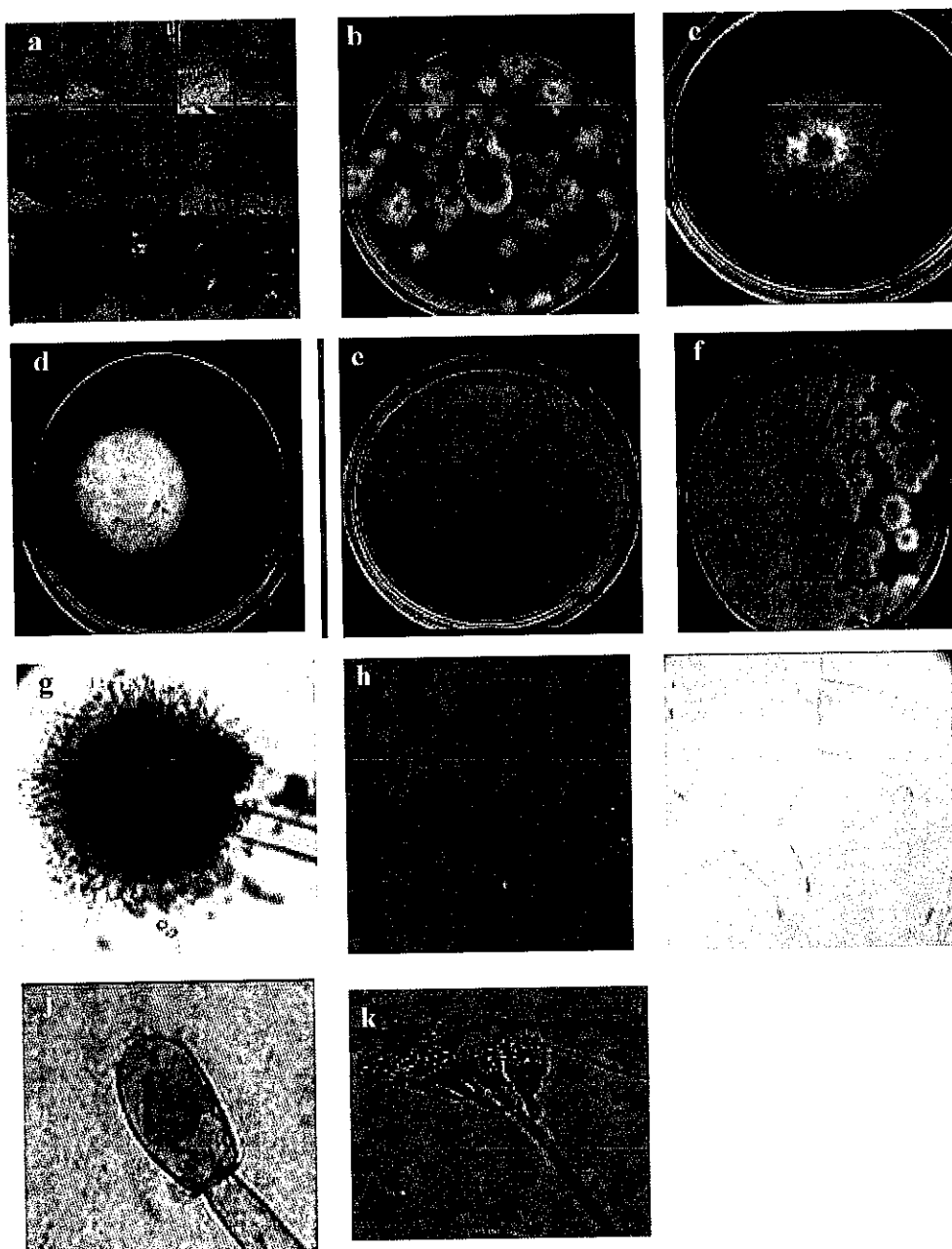


Fig. 1. Aislamientos *in vitro* e identificaciones de géneros. a) semilla de donde se aislaron los hongos. b) crecimiento micelial amarillo de *Aspergillus* sp. c) crecimiento micelial violeta- púrpura de *Fusarium* sp. d) crecimiento micelial blanco de *Fusarium* sp. e) crecimiento micelial grisáceo de *Mucor* sp. f) crecimiento micelial verde seco de *Penicillium* sp. g) cabezuela mostrando la doble serie de esterigmas de *Aspergillus* sp. h) fialide corta y en forma de botella de *Fusarium* sp⁽¹⁾. i) fialides largas de *Fusarium* sp(2). j) esporangioforo con protuberancias irregulares de *Mucor* sp. k) conidioforo en forma de escoba típico de *Penicillium* sp.

En el análisis estadístico del ABCPG de los hongos obtenidos para este parámetro se pudo observar que aunque no existieron diferencias significativas hablando estadísticamente, dentro de la comparación de medias, es importante destacar que los géneros *Aspergillus spp* y *Mucor spp* obtuvieron los valores más bajos del ABCPG (65.04 y 66.50) con respecto a los demás (Fig. 4), cuatro veces menos que el valor promedio del testigo (267.50), lo que nos dice biológicamente que estos hongos afectaron la germinación al inhibirla de manera total en ciertas repeticiones.

Las pruebas de patogenicidad *in vitro* han sido utilizadas y valoradas por otros autores. Vázquez (2003) en plántulas de chile realizó estas pruebas para *Fusarium sp* y *Penicillium sp*; González (2004) en plantas de tomate de cáscara para *Fusarium oxysporum* y *F. solani*, respectivamente, describiendo síntomas similares a los reportados en esta investigación.

4.3 Síntomas

Los síntomas y agresividad de los diferentes aislamientos fueron diversos. *Aspergillus sp* colonizó la semilla rodeándola completamente (Fig. 2) a los tres o cuatro días después de ponerla a germinar en la caja de Petri; se observó que la semilla podía emitir bien la radícula, desarrollar el hipocótilo, pero al momento que las hojas cotiledonales querían liberarse de la testa de la semilla el hongo ya había colonizado todos los tejidos expuestos (Fig. 3), provocando la inhibición de la germinación. El comportamiento anterior se debe a la capacidad de este hongo a producir enzimas tóxicas, las cuales tienen la capacidad de inhibir al embrión. En los dos aislados del género *Fusarium spp*,

el micelio cubrió todas las partes de la plántula hasta alcanzar el hipocótilo cubriéndolo totalmente, observándose un tipo de red o telaraña alrededor de la misma (Fig. 2); además, ocasionó una pudrición de raíz que se extendió conforme el hongo invadió los tejidos del tallo hasta provocar la muerte de la plántula (Fig. 3).

En el caso de *Mucor* sp el daño fue similar al de *Aspergillus* sp, ya que son hongos que crecen muy rápido sobre el medio de cultivo o sobre el sustrato. Al iniciar la germinación de la semilla o emitir la radícula, la semilla ya estaba invadida totalmente (Fig. 2); *Mucor* sp retraso la emisión de radícula hasta el sexto día cuando lo común era el cuarto ó quinto día y un día o dos es un gasto de energía que repercute directamente en que la semilla logre emitir la radícula y completar la germinación (Fig. 3).

El síntoma causado por *Penicillium* sp fue similar a *Aspergillus* sp y *Mucor* sp , el hongo cubrió rápido el sustrato, atacando a la semilla y emitiendo estructuras reproductivas sobre la misma (Fig. 2) antes de emitir la radícula, cuando ya la había emitido cubría las partes de la plántula hasta llegar al hipocótilo cubriendo la testa de la semilla e impidiendo que se liberara de la misma, provocando un desgaste de energía de la semilla y con ello la muerte (Fig. 3).

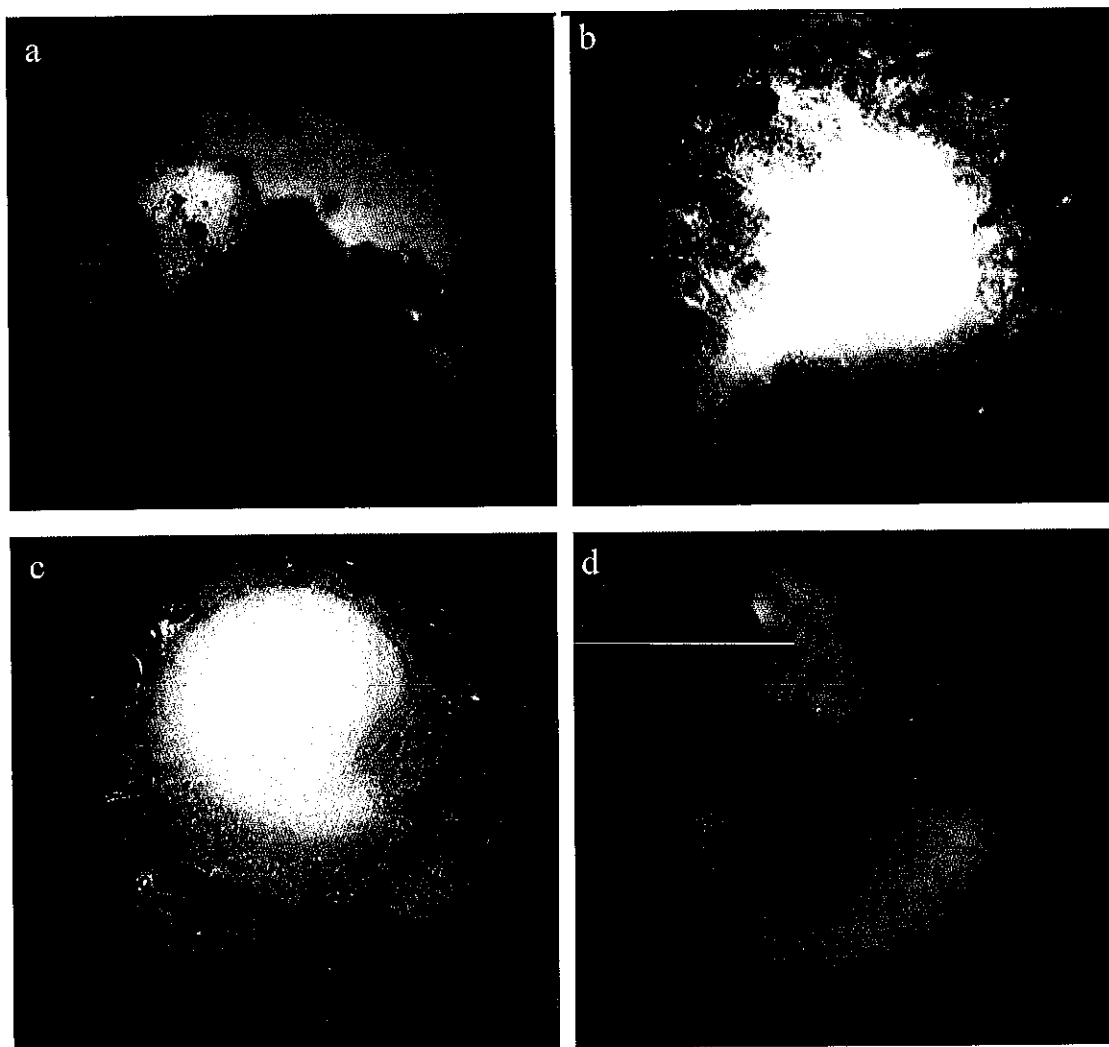


Figura 2. Síntomas de daños de en las semilla, a) colonización casi completa de *Aspergillus sp* sobre la semilla, b) colonización rápida de *Mucor sp*, c) la colonización de *Penicillium sp* fue menos densa que los demás hongo, aunque si se observan estructuras reproductivas del hongo sobre la semilla, d) la colonización de *Fusarium sp* fue una colonización completa, aunque no es todos los casos.

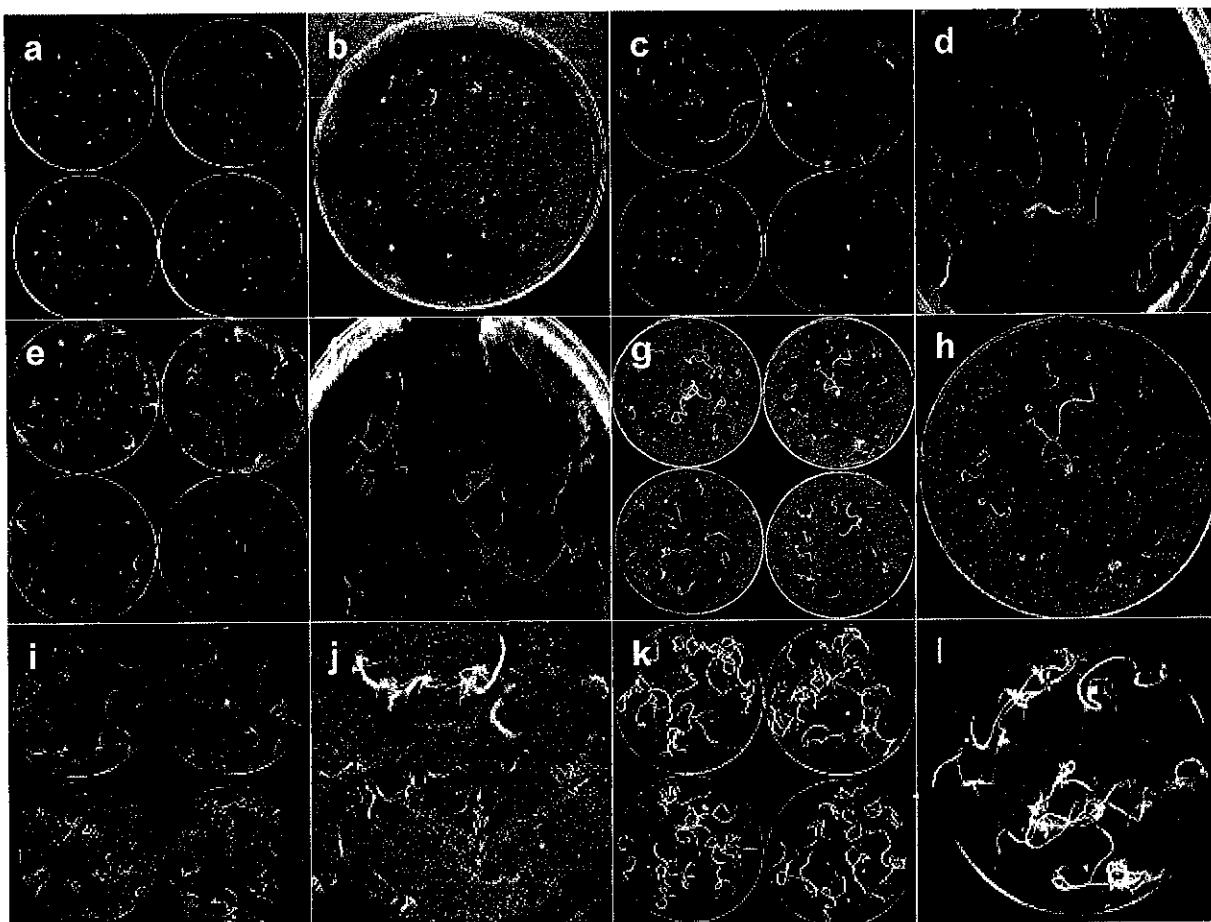


Figura 3. Síntomas producidos *in vitro* por patógenos aislados de plantas de tomate de cáscara, k y l son los testigos sanos; a y b) inoculados con *Aspergillus* sp, el hongo rodeo totalmente a la semilla impidiendo la germinación, la coloración negrusca es la formación de estructuras sobre la semilla y el sustrato; c y d) inoculados con *Fusarium* spp⁽¹⁾ la semilla pudo germinar pero las plántulas fueron atacadas por el hongo (micelio blancuzco sobre el sustrato) causando una necrosis y muerte; e y f) inoculados con *Fusarium* spp⁽²⁾ este hongo causó la muerte de las plántulas, al invadirlas totalmente (micelio blanco-algodonoso); g y h) inoculadas con *Mucor* sp impidió la germinación de semillas (micelio blanco-grisáceo) y las que emergieron fueron también invadidas y atacadas hasta matarlas; i y j) inoculadas con *Penicillium* sp. mostró un micelio color verde, este hongo ataca cuando las plántula ya ha emergido, no llegando a matar a todas las plántulas.

Cuadro 2. Incidencia progresiva de la germinación y área bajo la curva del progreso de la germinación en semillas de tomate de cáscara.

	D D S ^a										ABCPG ^b
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Testigo	0	0	0	0	0.135	0.322	0.440	0.652	0.757	0.850	267.50 a ^c
<i>Aspergillus</i> sp	0	0	0	0	0.021	0.064	0.107	0.178	0.183	0.192	65.04 a
<i>Fusarium</i> sp ⁽¹⁾	0	0	0	0	0.015	0.075	0.170	0.305	0.375	0.410	129.0 a
<i>Fusarium</i> sp ⁽²⁾	0	0	0	0	0.033	0.130	0.196	0.356	0.373	0.396	132.0 a
<i>Penicillium</i> sp	0	0	0	0	0.023	0.090	0.170	0.340	0.420	0.500	129.01 a
<i>Mucor</i> sp	0	0	0	0	0	0.060	0.130	0.190	0.190	0.190	66.50 a

^a Días Después de Siembra

^b Área absoluta bajo la curva de la germinación

^c Valores con la misma letra no presentaron diferencia significativa. Tukey al 95 % de confiabilidad.

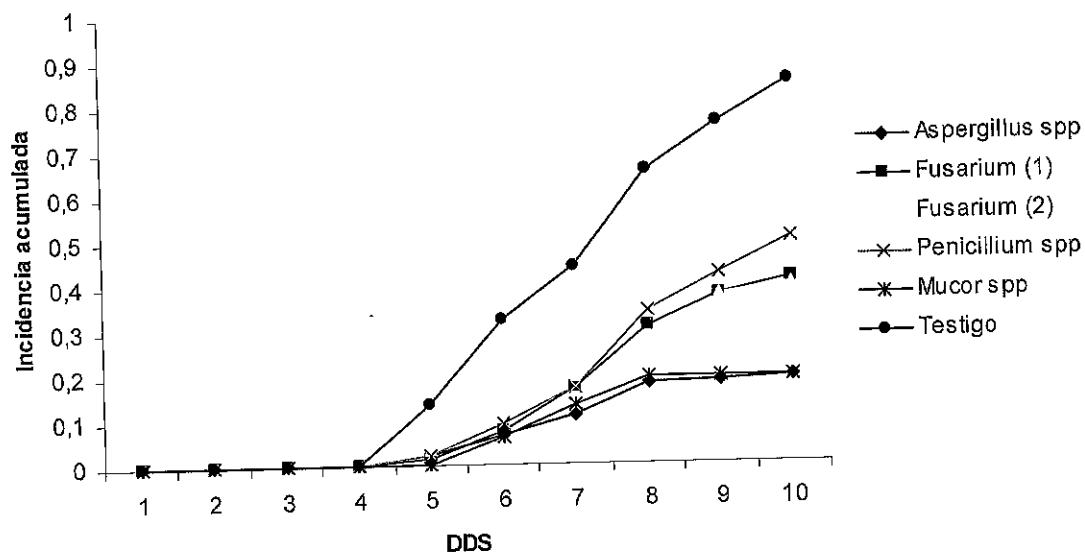


Figura. 4. Incidencia progresiva de la germinación de semillas de tomate de cáscara de los diferentes aislamientos patogénicos.

4.4 Efecto de los hongos patógenos en la germinación y la emisión de radícula

En el análisis de distribución de los diferentes hongos en las distintas localidades de donde se obtuvo la semilla, se observó de manera general que la variable emisión de radícula presentó diferencias significativas con valores altos de 81.16 hasta 92 %; en la variable germinación también se observaron diferencias significativas, siendo la localidad Salamanca la que presentó el porcentaje de germinación mas bajo con 27.31 % (Fig. 5).

En el análisis para cada género encontrado en la variable emisión de radícula se pudo observar que el testigo y el hongo *Mucor* sp no tuvieron diferencias

significativas, inclusive este hongo superó al testigo en el porcentaje de exposición de radícula. No así para la variable germinación, donde este mismo hongo fue el que más impactó, seguido por *Aspergillus spp*; ambos con promedios de germinación de 19 y 19.2 % (Fig. 6) respectivamente, en comparación con el testigo que tuvo un 85 % de germinación.

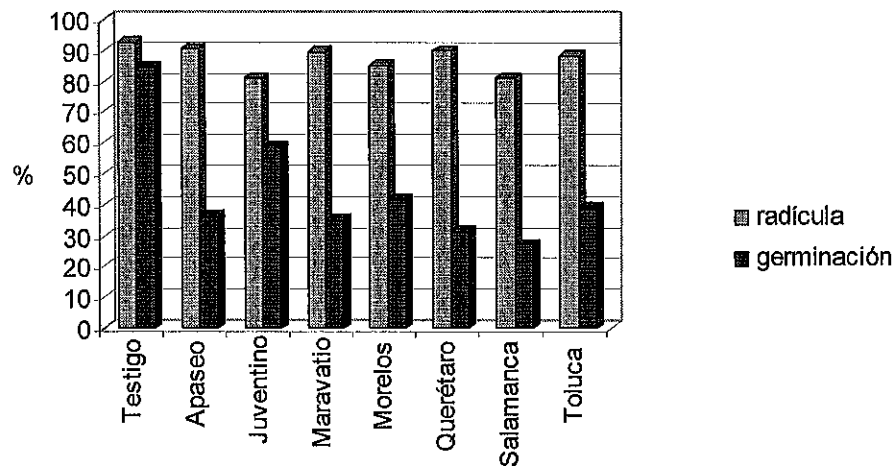


Figura 5. Porcentaje de emisión de radícula y germinación por localidad.

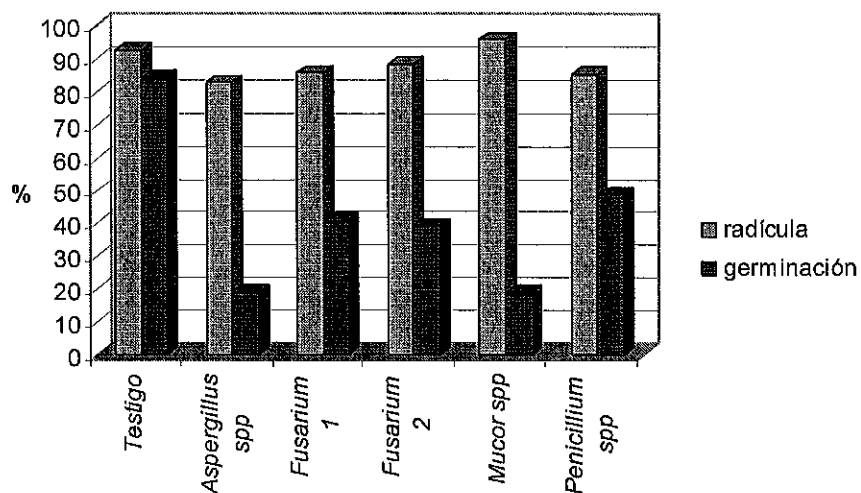


Figura 6. Porcentaje de emisión de radícula y germinación por género de hongo.

El valor del testigo esta en los parámetros normales de germinación para esta especie botánica y como para muchas otras especies.

El género *Aspergillus spp* fue el único que presentó diferencia significativa en emisión de radícula con respecto al resto con un 56 % (Fig. 7) en la localidad Juventino Rosas. Para la variable germinación todas las localidades presentaron porcentajes muy bajos, destacó aquí la semilla de la localidad Morelos con un valor de 34.8 %; el valor más bajo fue en la localidad Juventino Rosas con 1 % de germinación.

En Juventino Rosas y Salamanca el género *Fusarium spp*⁽¹⁾ (Cuadro 1), no presentó diferencias significativas y los porcentajes de germinación oscilaron entre 43 y 39 % de germinación respectivamente (Fig 7). Quizá este hongo pudiera tener influencia en la marchitez del tomate de cáscara en planta adulta, como lo reportó González (2004). La presencia en semilla y el sistema radicular, indica que mucha de la semilla obtenida proviene de frutos que fueron atacados por el hongo y haberse transmitido a la semilla este inoculo primario el cual es capaz de producir nuevas infecciones en plántula y durante el desarrollo del cultivo.

El género de *Fusarium spp*⁽²⁾, se encontró en las localidades de Toluca y Morelos (Cuadro 1) presentó un efecto en la germinación con un 38 y 40.5 % (Fig. 7).

Penicillium spp fue el único que se presentó en todas las localidades y sitios de muestreo de semilla, reportó diferencias significativa entre todas las localidades; los valores fluctuaron de 81.11 a 89.8 % de emisión de radícula. La variable germinación presentó diferencias significativas en la semilla proveniente de Maravatio, con el porcentaje más bajo de germinación 38.22 % (Fig 7), estadísticamente igual a la semilla de las localidades de Querétaro, Apaseo el Grande y Toluca; mientras la localidad Juventino Rosas presentó un 66.1 %.

Por último el hongo del género *Mucor sp* solo se presentó en la semilla proveniente de Toluca (Fig 5), donde el porcentaje de emisión de radícula fue el más alto, no así la germinación con 19 %.

El bajo porcentaje de emisión de radícula se pudo deber a que la semilla estuvo expuesta al hongo directamente y al absorber agua se expande y los microporos se hacen grandes; dicho evento da lugar a la entrada de las hifas las cuales colonizan hasta llegar a producir las estructuras reproductivas, como lo demuestra Gil (1991), quien indica que el hongo se sitúa en la cubierta seminal y después penetra al embrión, inhibiendo la emisión de radícula y por tanto la germinación. Los géneros *Aspergillus spp*, *Mucor spp*, *Penicillium spp* fueron los de mayor impacto a la germinación. Estos hongos son cosmopolitas y crecen casi en cualquier medio y algunos de ellos pueden emitir sustancias tóxicas que se difunden en el embrión y alteran la viabilidad de la semilla y no permite la germinación normal (Richardson 1979, Vázquez 1985).

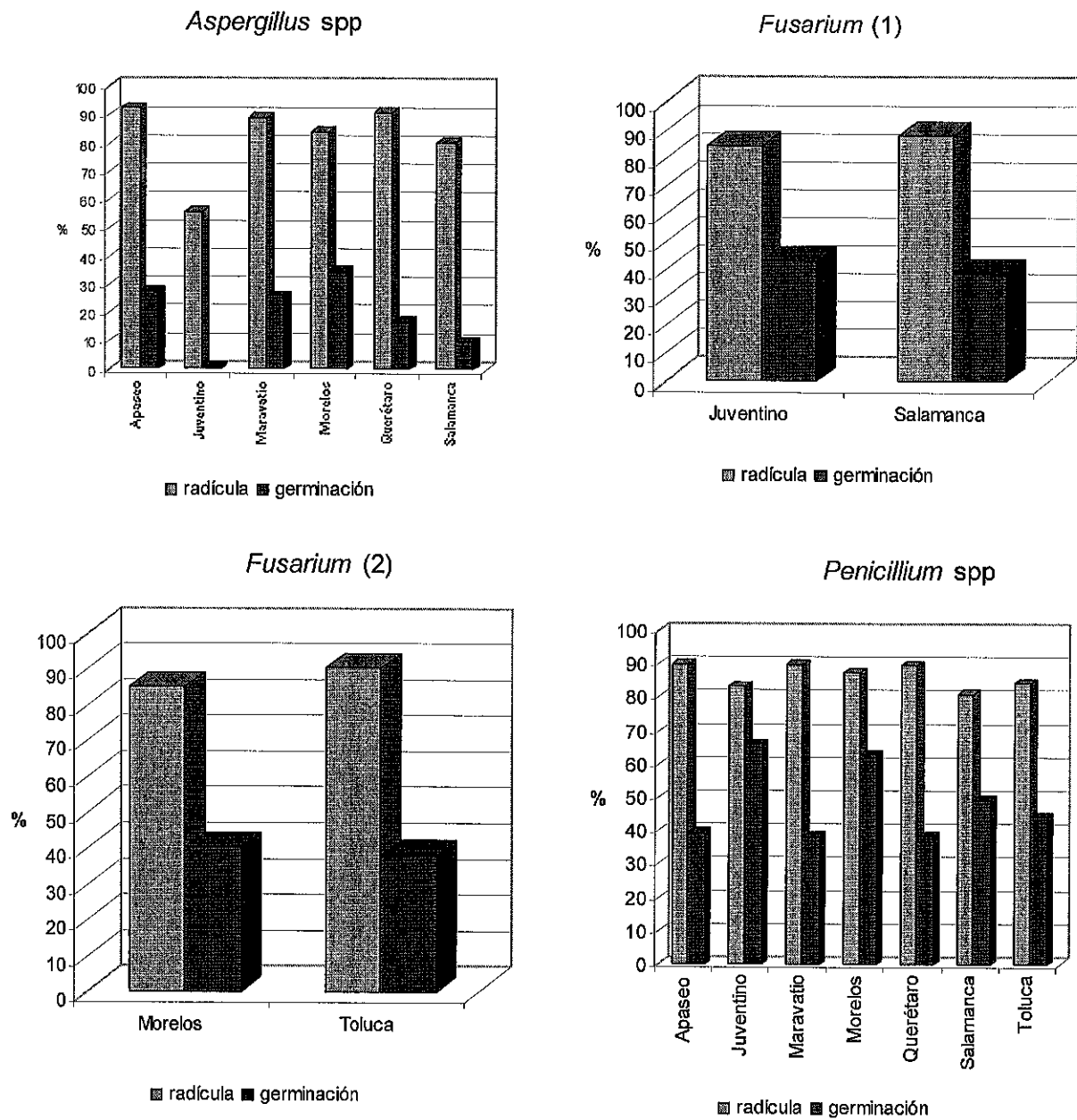


Figura 7. Porcentaje de emisión de radícula y germinación por género de hongo y localidad.

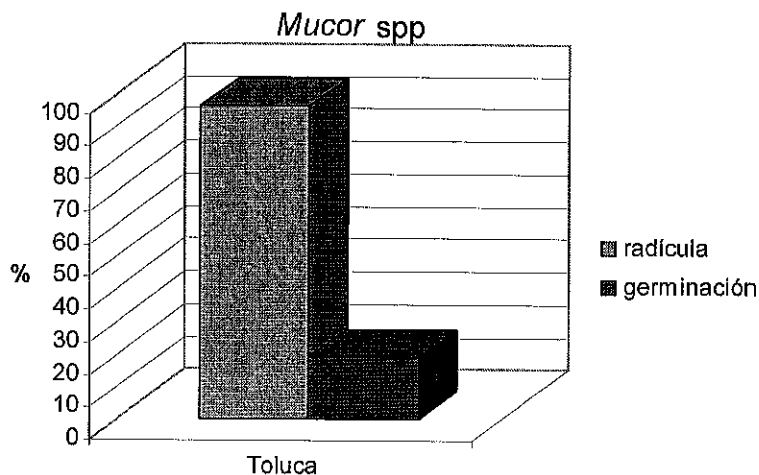


Figura 8. Porcentaje de emisión de radícula y germinación por género de hongo y localidad.

4.5 Distribución de los hongos por cada localidad

El 13.25 % del total de aislados fue obtenido de Apaseo el Grande, con dos aislamientos de *Aspergillus* spp. y seis de *Penicillium* spp. (Fig. 9)

La localidad de Juventino Rosas presentó los géneros *Penicillium* spp con trece aislamientos, *Fusarium* spp⁽¹⁾ y *Aspergillus* spp un aislamiento respectivamente. (Fig. 9), con un total de quince aislamientos que representa el 18.10 %.

De Maravatio se obtuvieron trece aislamientos, nueve de *Penicillium* spp y tres de *Aspergillus* spp lo que representó el 15.66 % (Fig. 10).

En Morelos el número de aislamientos obtenidos fue de nueve que representó el 13.25 %, ocho de *Aspergillus* spp, uno de *Fusarium* spp ⁽²⁾, y dos de *Penicillium* spp (Fig. 10)

Para Querétaro el porcentaje fue de 3.61 % con un aislamiento de *Aspergillus* spp. y dos de *Penicillium* spp (Fig. 10).

En la localidad de Salamanca se obtuvieron los géneros *Aspergillus* spp con doce aislamientos, *Penicillium* spp con once y *Fusarium* spp⁽¹⁾ con un solo aislamiento (Fig 10), para un total de veinticuatro aislamientos que representó el 31.32 %, convirtiéndola en la localidad con el mayor número de aislamientos.

Para la localidad de Toluca los géneros de *Mucor* spp, *Fusarium* spp ⁽²⁾ y *Penicillium* spp con uno, dos y tres aislamientos respectivamente (Fig. 11), para un total de seis aislamientos, lo que representó el 8.33 % del total de los aislamientos.

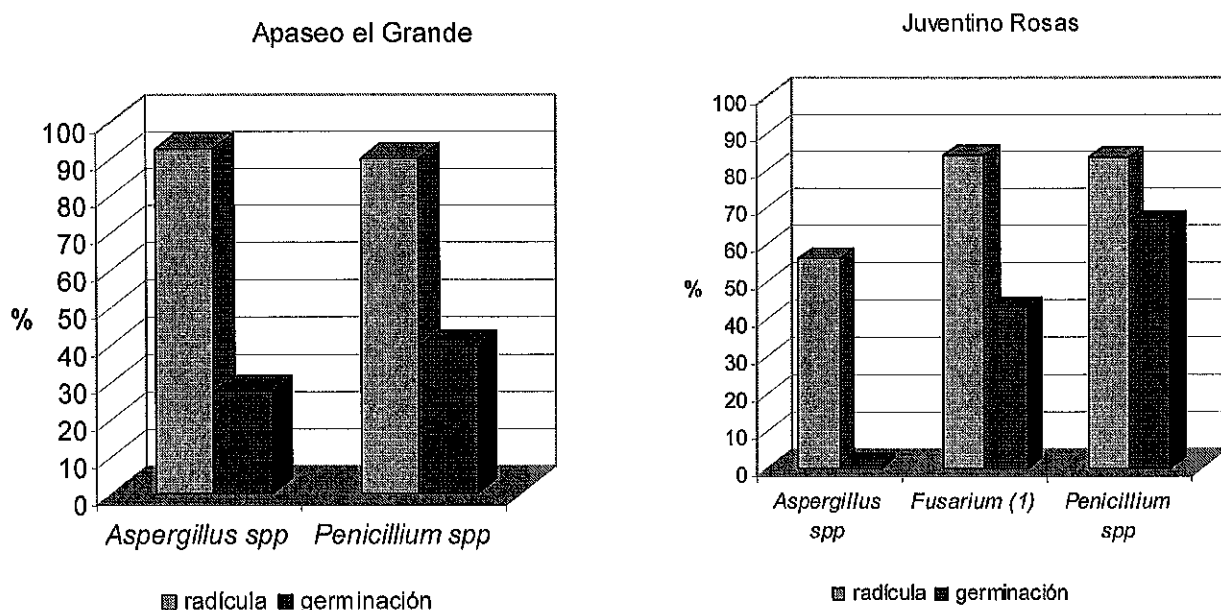


Figura 9. Porcentaje de emisión de radícula y germinación por localidad y género de hongo.

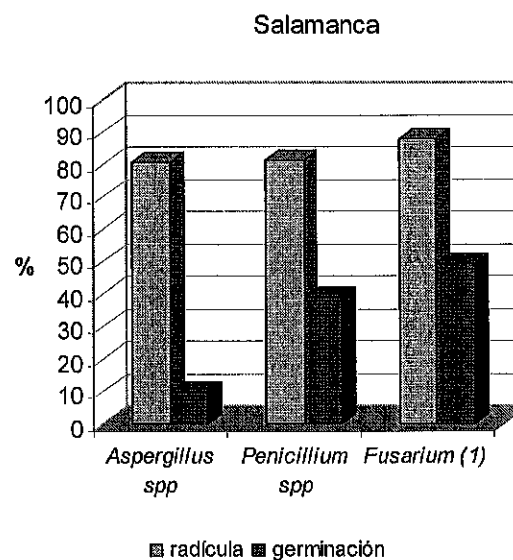
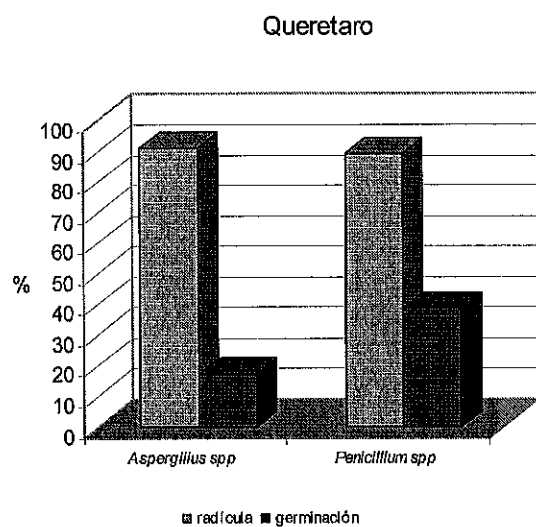
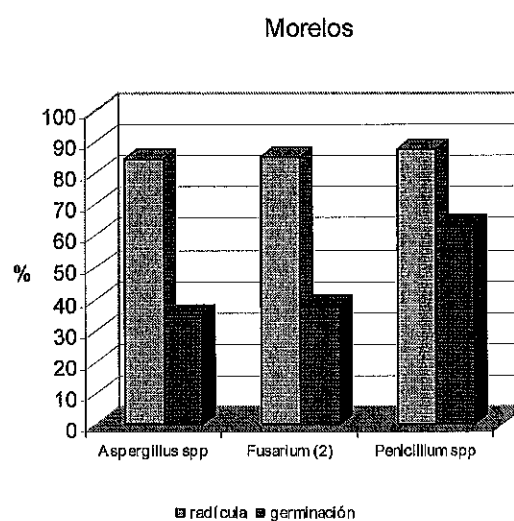
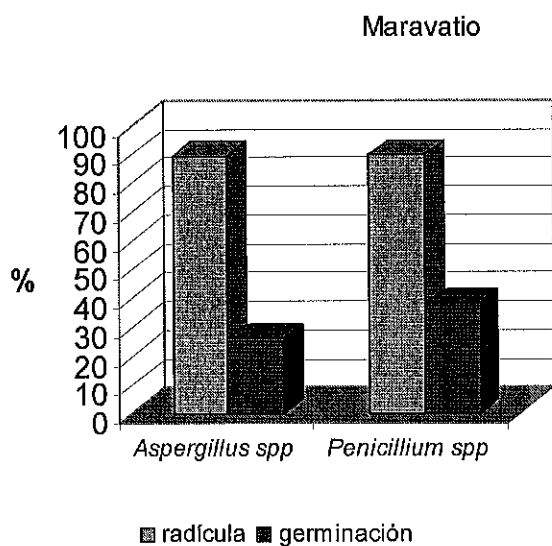


Figura 10. Porcentaje de emisión de radícula y germinación por localidad y género de hongo.

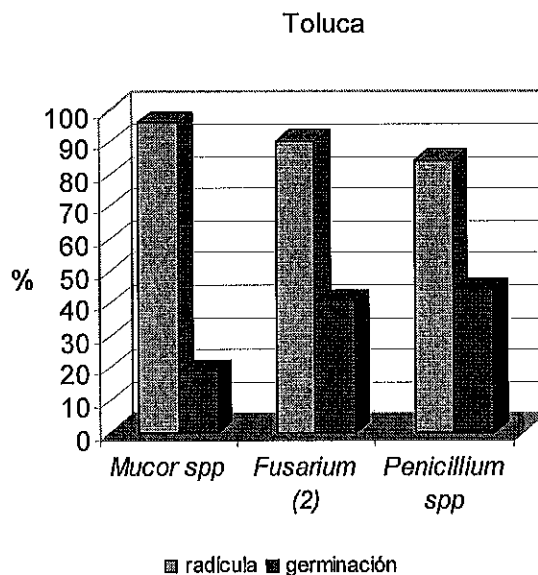


Figura 11. Porcentaje de emisión de radícula y germinación por localidad y género de hongos.

4.6 Identificación de los hongos patógenicos

4.6.1 Identificación a especie de *Aspergillus* spp

El hongo presentó esporulación y crecimiento rápido en diferentes medios de cultivo (PDA, Malta-Agar y Czapek-Agar). Produjo colonias de color blanco amarillento al principio y después de algunos días mostró colonias de color negro, lo cual coincide con lo reportado por Smith (1963) (Fig. 12).

Aspergillus sp presentó colonias que crecen rápido con micelio abundante y sumergido, sin color en PDA, presento un color amarillento en las hifa. Cabezas conidiales partidas en cuatro columnas sueltas, compuestas de conidios en cadenas (sobre de 15 conidios por cadena). Conidioforo hialino a café pálido de

740 x 10.10 μm , erecto, simple de pared gruesa, las células basales en forma de pie, no septado, con el ápice inflado, formando vesículas globosas a subglobosas de pared gruesa comúnmente de 55-75 μm de largo y fialides de 5-13.8 μm de largo, reducidas en forma aguda antes del ápice de color café amarillo. Las series de esterigmas que presentó fueron dos, una serie de esterigmas jóvenes y en pequeñas cabezas, pero típicamente en dos series sin color o de color café claro. Las series de esterigmas primarias están juntas o empacadas, cubriendo la vesícula, la segunda serie de esterigmas son más uniformes el rango es de 6-10 x 2 a 3 μm , ambas series a menudo menos cafés que cerca del negro. Conidios globosos cuando maduran con paredes suaves de color café difuso a café negro de apariencia áspera o espinulada de 2.5 a 4 μm ocasionalmente de 5 μm (Fig. 12). Características que coinciden con las mencionadas por Thom and Raper, (1945), Kosakiewics (1989) y Watanabe, (2002), para identificar a *Aspergillus niger* Van Tieghem.

4.7 Identificación a especie de los géneros de *Fusarium* spp

El hongo denominado *Fusarium* spp⁽¹⁾ se desarrollo muy bien en medio PDA formando todas sus estructuras macro y micronidios, fialides y clamidosporas, se corrobora la especie por la producción de color en tubos con PDA + pulpa de papa (Nelson et al., 1983). La presencia de microconidios abundantes, de forma oval a elipsoidal, algunas veces curvados y generalmente unicelulares de 4.83-9.31 x 2.4-3.1 μm . Los macroconidios hialinos, abundantes de tres a cinco septas y forma alargada muy finos y curvados en forma de luna, célula apical

ligeramente aguda y con forma de pie en la célula basal, de 28.62-32.8 x 2.51-4.11 μm , desarrollados en monofialides y en par. La colonia en cajas y tubo con PDA fue rosa con ligera pigmentación violácea, micelio algodonoso coloración en tubo de PDA + pulpa fue rosa algodonoso (Fig. 13). Las características coinciden con las mencionadas por Booth (1971) y Nelson, *et al.* (1983) para identificar a *Fusarium oxysporum* Schlecht. Emend. Snyder & Hans.

El género de *Fusarium* spp⁽²⁾ presentó micronidios generalmente unicelulares, ovales un poco más largos que los de *F. oxysporum* de 8.30-13.2 x 2.43- 3.0 μm , macroconidios abundantes de 3 a 5 septas, cilíndricos con la célula basal redondeada y la célula apical aguda y redondeada. La ramificación de las fialides fue lateral, en general muy largas, adelgazándose en la parte terminal donde hubo producción de conidios. Se observaron clamidosporas individuales y en par, en la parte terminal, intercalada. El color de la cepa en tubos tuvo una coloración crema en la parte anterior y posterior (Fig. 14). Características que coinciden con las mencionadas por Booth (1971) y Nelson, *et al* (1983), para identificar a *Fusarium solani*. (Mart.) Appel & Wollenw. Emend. Snyder. & Hans.

4.8 Identificación a especie del género *Mucor* spp

El hongo presentó un crecimiento rápido en la colonia, con una coloración poco oscura más o menos gris –oscura. Esporangioforos ramificado en simpodio simple o monopodio de 21 μm de ancho, inmediatamente estrecho debajo del esporangio de paredes delicadas. El primer esporangio es hialino, después se

oscurece y se torna de color gris-café, la cubierta que rodea al esporangio es distintivamente espinulosa con cristales de oxalato de calcio que se rompe al madurar. La columnela piriforme y ovoide, elipsoidal a cilíndrico – elipsoidal de 50 -72 x 25 – 50 μm , de color café o gris, usualmente provista con una o varias proyecciones o protuberancias irregulares de 5 μm de largo por 2 μm de ancho, característica distintiva a especie dentro de las especies de *Mucor* sp que existen. Esporangiosporas globosas (poco elipsoidales o de formas irregulares) de 5-8 μm de diámetro, café amarillentas densamente equinuladas. Clamidosporas algunas veces presentes en el esporangioforo pero no abundantes (Fig. 15). Todas las características coinciden con Domsch and Gams, (1980), Watanabe, (2002) para identificar a la especie como *Mucor plumbeus* Bororden.

4. 9 Identificación a especie del género *Penicillium* spp

De acuerdo con Pitt (1988), los *Penicillium* que no forman o no tienen teleomorfo (fase sexual) se clasifican en cuatro subgéneros, tomando en cuenta la complejidad de la estructura de fructificación (penicil o conidióforo). Si el conidióforo sólo tiene un punto de ramificación entre la punta de fialide y el estípite, entonces la cepa pertenece al subgénero *Aspergilloides*. Si tiene dos puntos pertenece a los subgéneros *Furcatum* o *Biverticillium*; dependiendo de la relación fialide/metula, metula/estípite, diámetro de la colonia en medio G25N y la forma de la fialide. Y si presenta tres o mas puntos de ramificación, la cepa se clasifica en el subgénero *Penicillium*.

El hongo previamente identificado como *Penicillium*, presentó ramificación triverticilada y cuativerticilada (Fig. 16), por lo que se clasificó dentro del subgénero *Penicillium*.

Las observaciones del conidióforo de cultivos desarrollados en medio CYA (Czapek Extracto de Levadura Agar) y las características de las colonias en los tres medios permitieron identificar al hongo como *Penicillium chrysogenum*, que presento: rami en promedio de 15 μm de longitud por penicilli; metulas corta y aplanadas de 11.6 μm de longitud; fialides ampuliformes de 6.3 μm con colula corta, conidios elipsoidales o subesféricos de 2.5-4.0 μm de largo de paredes lisas y crecen en columnas irregulares. En CYA las colonias son acanaladas radialmente de 35 μm de longitud de diámetro, amarillas por el reverso de la caja y pigmento soluble del mismo color. En MEA (Extracto de Malta Agar) colonias de 25 μm de diámetro, conidiogenesis densa, de apariencia algodonosa en el centro, algunas veces granular, micelio inconspicuo de color verde mate con los bordes grises.

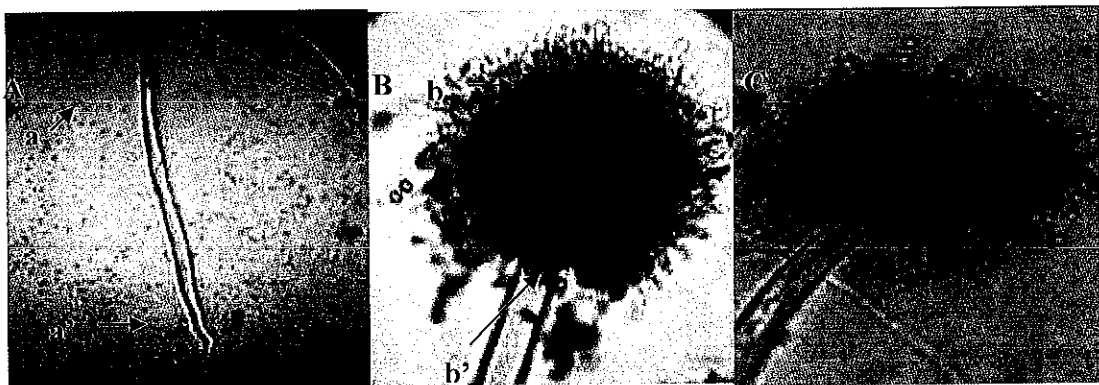


Figura 12. Características morfológicas de *Aspergillus niger* A) a cabeza conidial (20X), a' conidioforo liso (20X); B) b Esterigmas en dos series (100X), b' vesícula globosa (100X); C) c conidios en cadena

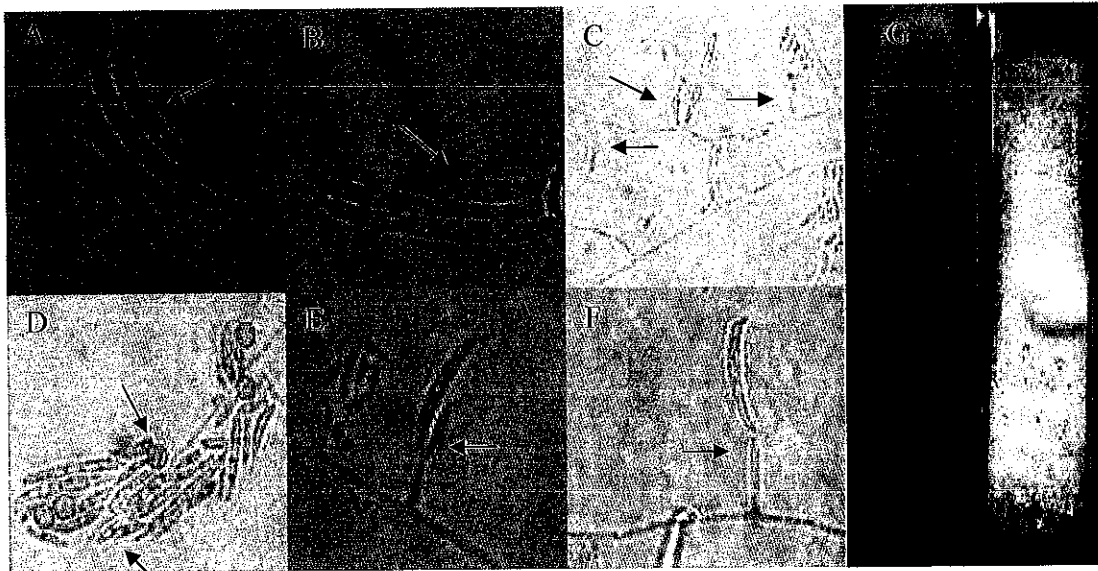


Figura 13. *Fusarium oxysporum*. A y B) Macroconidios (100X), C) fialides cortas y en forma de botella (100X), D) presencia de clamidosporas y microconidios (100X), E) macroconidioforo ramificado lateralmente (100X), F) macroconidioforo solitario (100X) y G) Colonia rosada con pigmentación violeta en PDA+pulpa de papa a los 10 días de edad (frente y anverso).

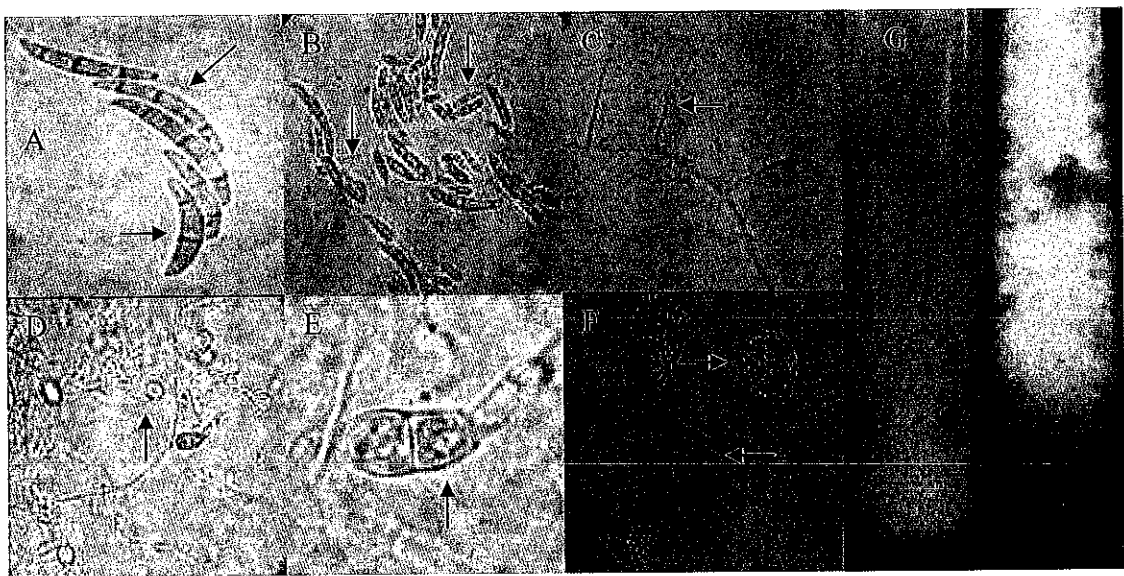


Figura 14. *Fusarium solani*. A) Macroconidios de 3 y 4 células (100X), B) Microconidios de una y dos células (100X), C) Monofialides (100X), D) Clamidosporas solitarias (100X), E) Clamidosporas en par (100X), F) microconidios agrupados en falsas cabezas, formados en fialides largas (40X) y G) Colonia blanca con pigmentación crema en PDA + pulpa de papa a los 10 días de edad (reverso y frente).

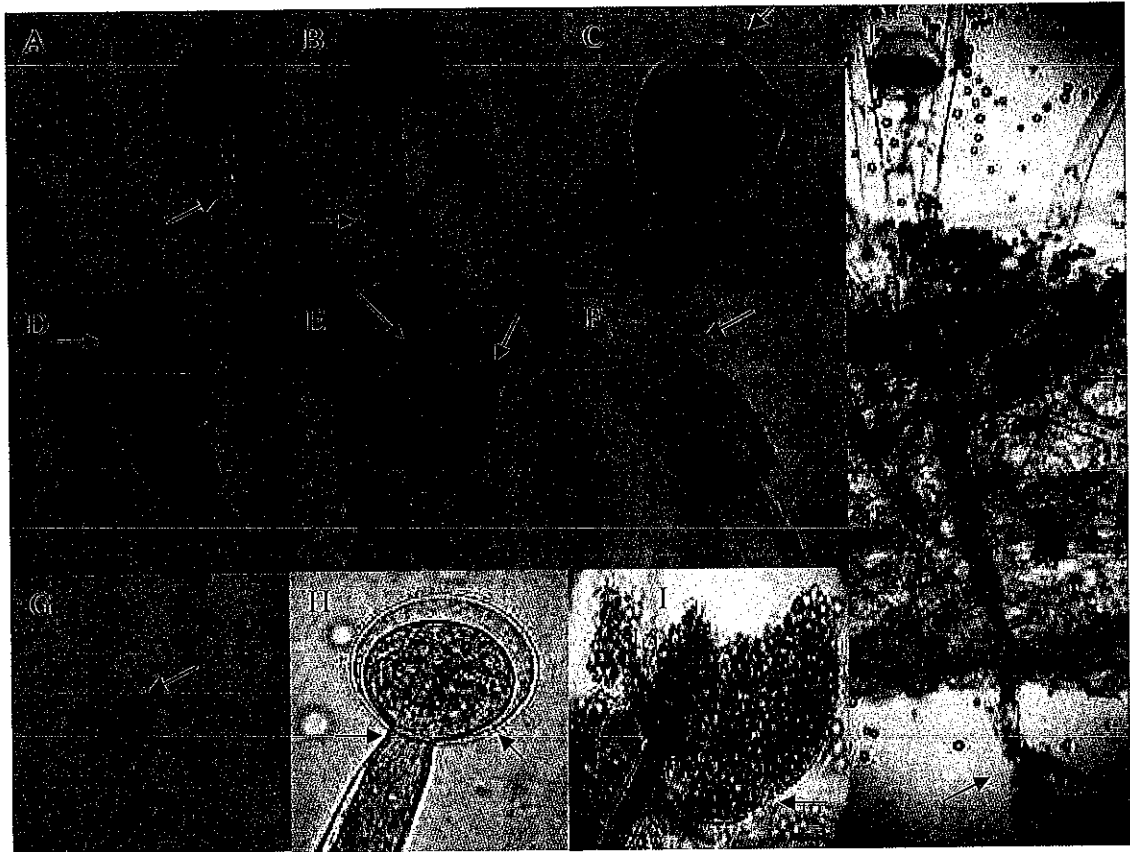


Figura 15. *Mucor plumbeus*. A y B) Esporangióforo ramificado (20X), C, D, E ,F) columnela con proyecciones irregulares, distintivo de la especie *M. plumbeus* (100X), G) esporangiosporas globosas, de color café palido, poco elipsoidales y de forma irregular (100X), H) esporangióforo hialino en las primeras etapas, constricto inmediatamente abajo del esporangio(100X), I) pared del esporangiórofo distintivamente espinulada que se rompe cuando madura (100X), J) esporangióforo, columela y base sin rizoides característica que lo separa de *Rhizopus* sp (20X).

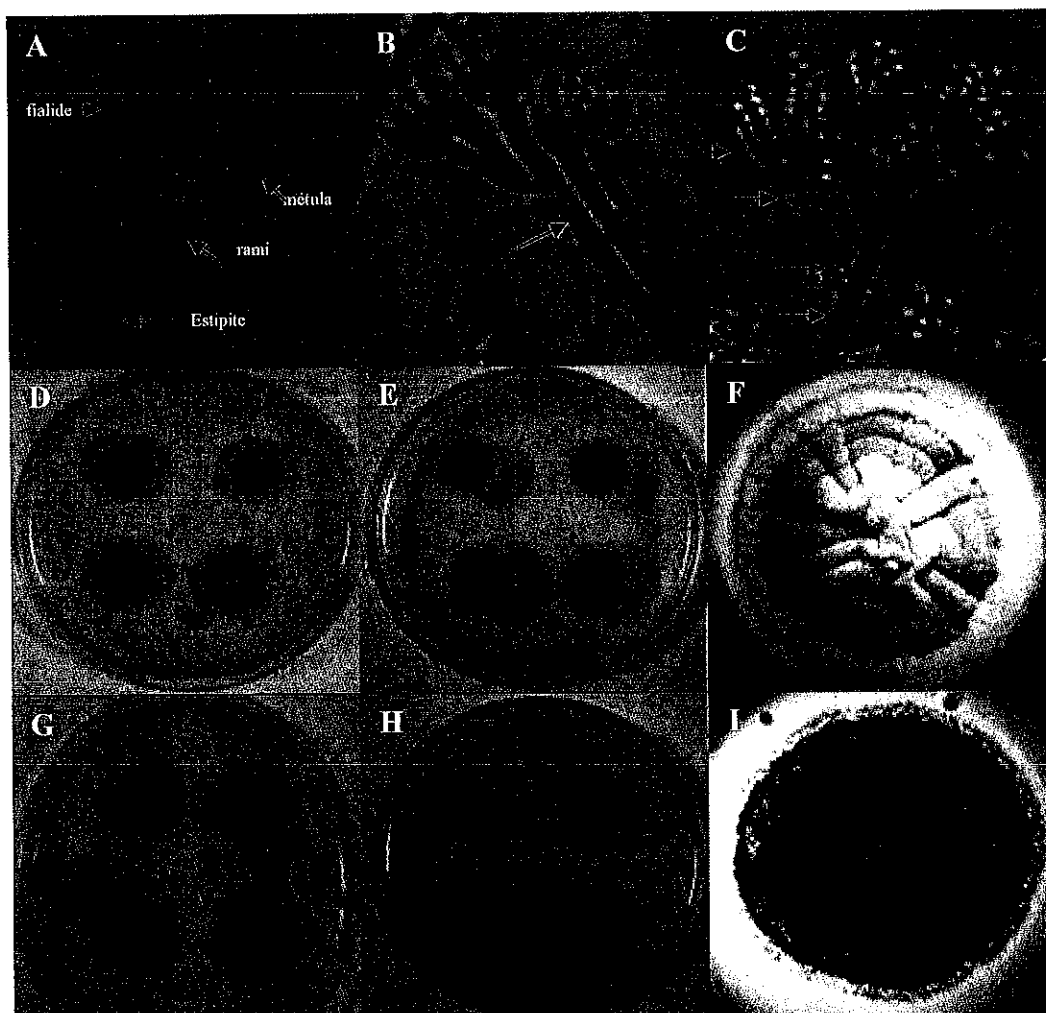


Figura 16. *Penicillium chrysogenum*. A) Estructura y características del conidióforo de *P. chrysogenum* (40X), B) pared del conidióforo lisa (100X), C) conidioforo cuartiverticidal, es decir de cuatro divisiones entre cada unión (100X) D y E) Colonia crecida en Extracto de Levadura Agar (CYA), mostrando el anverso y reverso respectivo, así como pigmento soluble de color amarillo ; F) crecimiento acanalado sobre el medio CYA; G y H) colonia crecida en Extracto de Malta Agar (MEA), mostrando reverso y anverso; I) crecimiento radial de color verde seco.

4. 10 Virus encontrados en follaje y semilla

El virus que se encontró después de realizar la prueba de ELISA en muestras de follaje colectadas de las localidades de Salamanca y Juventino Rosas fue el Tobacco Mosaic Virus (TMV). Resultados que coinciden con lo reportado con De la Torre (1996), quien menciona que este virus puede provocar diversos síntomas como mosaicos ligeros a severos, moteados amarillos y Cálico de color blanco-amarillo (Fig 17). Agrios (2001), mencionó que el TMV se transmite fácilmente de manera mecánica lo que explica el porque se encontró en las localidades antes mencionadas.

En las muestras de semilla analizadas se detectó el virus Cucumber Mosaic Virus (CMV) solo en Juventino Rosas. Pinto (1993), reportó que el virus entra al embrión y permanece hasta la madurez. Agrios (2001), mencionó que una pequeña cantidad de entre el 1 al 30 % de las semillas provienen de plantas infectadas por un virus. Este pudo haber sido el caso del CMV encontrado en la semilla analizada de la localidad antes mencionada.

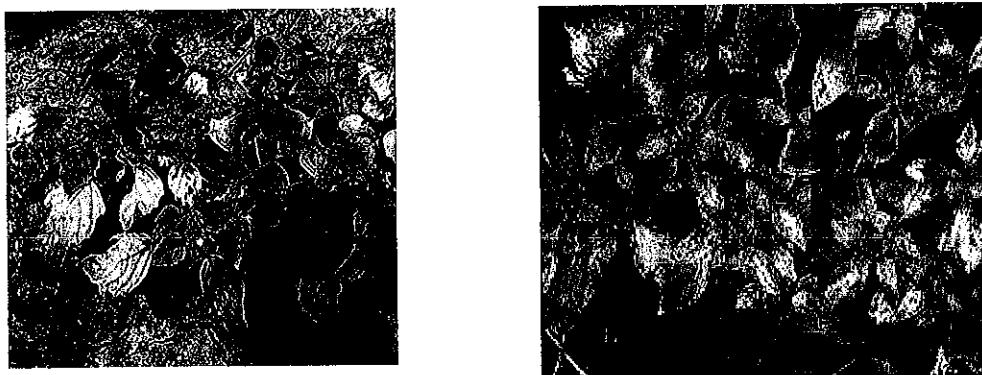


Figura. 17 Síntomas de virosis en follaje de tomate de cáscara en el Bajío Guanajuatense.

5. CONCLUSIONES

1. Los hongos que se identificaron en las semillas de tomate de cáscara fueron: *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Mucor plumbeus* y *Penicillium chrysogenum*.
2. En las pruebas *in vitro* el menor porcentaje de germinación lo ocasiono *M. plumbeus* y *A. niger*. El mayor porcentaje se obtuvo con *P. chrysogenum*.
3. En semillas de tomate de cáscara provenientes de Juventino Rosas se detectó al Cucumber Mosaic Virus (CMV).
4. En las localidades de Juventino Rosas y Salamanca se detectó al Tobacco Mosaic Virus (TMV), en follaje de tomate de cáscara.

6. LITERATURA CITADA

- Agrawal, V K., and Sinclair, J. B. 1988. Principles of seed pathology (Vol 1 and I). CRC. Press, Inc. Boca Raton, Florida. 248 p.
- Agrios, N., G. 2001. Fitopatología. Ed. LIMUSA. México 756 p.
- Azorin R., M. 1997. Comportamiento del Tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot) en un suelo salino del municipio de Atenco Edo de México . de México. Tesis de licenciatura. Depto. de Fitotecnia. U.A.CH. Chapingo, Méx.
- Bennet, C. W. 1969. Controlling seed and insect-borne viruses, Capitol 6 pag. 67. In Pathogens Vectors and Plant diseases approaches to control of harris and Maramorosch. Academic Press 1982.
- Booth, C. 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute Kew, Surrey. England. 237 p.
- Bos, L. 1983. Introduction to plant virology. Ed. Center of Agricultural Publishing and Documentation 160 p.
- Burguess, L.W., Summerell, B. A. Bullock, S., Gott, K. P., and Backhouse, D. 1994. Laboratory manual for *Fusarium* research. 3rd ed. University of Sydney. 133 p.
- Campbell, C. L., and Madden, V. L. 1990. Introduction to plant disease epidemiology. John Wiley & Sons, Inc. USA. 532 p.
- Christensen, C. M. and Kautmann, H. H. 1965. Deterioration at stored grain by fungi. Annu. Rev. Phytopathol. 3:69-84.

- Cook, M. T. 1947. viruses and virus diseases of plants. 244 p.
- De la Torre, A. R., Téliz, O. D., Barron, B. K., Cárdenas, E.,García, L. E.,Cárdenas, M. and Valverde, R. A. 1995. Detection of a viral complex in tomatillo *Physalis ixocarpa* in the central High Plateau of México. *Phytopathology* 85: 509-513.
- De la Torre A., R. 1996. Caracterización histológica y molecular de un complejo viral en tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.) en los valles altos de México. Tesis de Doctor en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillos, México. 93p.
- Domsch, K.H. and Gams, W.1980. Compendium of soil fungi. Vol 1. APS Press, St Paul, Minnesota. 646 p.
- Gil, O. R. 1991. Transmisión de enfermedades por las semillas de hortalizas, su prevención. Ministerio de Agricultura Pesca y alimentación. Neografis, S. L. Madrid, España. 16 p.
- González, P. B. E. 2004. Etiología de la marchitez del tomate de cáscara (*Physalis philadelphica* LAM.) en el estado de Guanajuato y su control. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillos, Texcoco, Edo. de México. 49 p.
- Kosakiewics, Z. 1989. *Aspergillus* species on stored products. CAB. International Mycological Institute. Ferry lane, Kew. Wallingford, UK. Mycological papers No. 161. 188 p.
- Lange, L. and Heide, M. 1986. Dot inmunobindid (DIB) for detection of virus in seed. *Canadian J. of Plant Pathology* 8: 373-379.

- Lara, V., F. 2000. Hongos en la semilla de chile *Capsicum annuum* L. y su patogenicidad. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillos, Texcoco, Edo. de México.
- López, C. J. M. 1988. Identificación y control de hongos en semilla de cacahuete (*Arachis hipogea* L.) Tesis de Ingeniero Agrónomo especialista en Zonas Áridas. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 86 p.
- Mattheuws, R.E.F. 1992. Fundamentals of plant virology. Acad. Press, Inc. USA. 403 p.
- Manners, J. G. 1986. Introducción a la Fitopatología. Ed. Limusa 295 p.
- Maude, R.B. 1996. Seed-borne diseases and their control principles and practice. CAB. INTERNATIONAL.
- Mendoza, Z. C. 1996. Enfermedades fungosas en hortalizas. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Edo. de México. 85 p.
- McGee, D. 1998. Perspectivas de las enfermedades transmitidas por la semilla. Curso Internacional sobre Tecnología de Producción de Semillas de Maíz. CIIMYT, El Batán, Edo. de México. 5 p.
- Moreno, E., y Zamora J. 1978. Guía para evitar problemas causados por hongos en semillas de granos almacenados. Instituto de Biología; UNAM. División Agropecuaria. Editorial Merckschapp y Dohme de México S.A. de C.V. 100 p.

- Mridha, M.A.U. and Sididique, A.B.M. 1989. Fruit rot chilli in relation to seed infection. *Seed Research*. 17: (2) 174-177.
- Neergard, P. 1977. *Seed Pathology*. Vol. 1 and 2. Macmillan, London. 187 p.
- Nelson, P. E., Toussoun, T.A., and Marasas, W. F.O. 1983. *Fusarium* species. An illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University. USA. 193 p.
- Olmedo, V. G. 1958. Semillas de maíz. Comisión Nacional del Maíz. S.A.G. México. 168 p.
- Peña, L., A. y F. Márquez S. 1990. Mejoramiento genético del tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.). *Revista Chapingo* 71-72:84-88.
- Pinto, C. B. 1993. Manual de prácticas de virología agrícola. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Edo. de México. 134 p.
- Pitt, I.J. 1988. A laboratory guide to common *Penicillium* species. 2nd edition. Commonwealth scientific and industrial research organization, Division of food processing. Australia. 177 p.
- Ramírez, G. M. 1984. Almacenamiento y conservación de granos y semillas. 10 edición. Editorial Continental S.A. de C.V., México 300 p.
- Raymond, G. A. 1989. Producción de semillas de plantas hortícolas. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 330 p.
- Richardson, M.J. 1979. An annotated list of seed-borne diseases. 3^a ed. Department of Agricultura and Fisheries for Scotlan Agricultura Scientific Services. Edinburgh, Scotland.

- SAGAR. 2000. Subsistema de información agrícola. SIACON. Base de datos.
- Santiaguillo H., J. F. 1995. Estabilidad del rendimiento de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.).
- Smith, G. 1963. Introducción a la micología industrial. Editorial ACRIBIA. Zaragoza, España. 443 p.
- Thom, C. and Raper, K. B. 1945. A manual of the Aspergilli. The Williams & Wilkins Company. Baltimore, USA. 373 p.
- Vázquez, L. A. 2003. Etiología de la marchitez del chile de agua (*Capsicum annuum* L.) en tres localidades de los valles centrales de Oaxaca, México. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillos, Texcoco, Edo. de México. 112 p.
- Vázquez, O. G. 1985. Evaluación de dos tipos de funguicidas y efecto de hongos en la fase de germinación y establecimiento en semilla de arroz (*Oriza sativa* L.) bajo condiciones controladas. Tesis de Ingeniero Agrónomo Especialista en Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Edo. de México 89 p.
- Warham, E. J., L.D. Butler y B.C. Sutton. 1997. ensayos para la semilla de maíz y trigo. Manual de Laboratorio. CIMYT. México, D.F. 84 p.
- Watanabe, T. 2002. Pictorial Atlas of soil and seed fungi, Morphologies of Cultured Fungi and Key to species. Second edition. CRC Press. Boca Raton, Florida. 486 p.

7. APÉNDICE

1. Solución de Hipoclorito al 1 % (para 100 ml de solución)

Ingredientes	Cantidad
Blanqueador "Cloralex"	16.66 ml
Agua destilada.....	83.34 ml

Procedimiento. Para obtener la concentración deseada de la solución al 1 % se utiliza la siguiente formula.

$$V_1 C_1 = V_2 C_2$$

Donde:

V_1 = Volumen necesario de cloro para preparar 100 ml de solución de cloro al 1%; C_1 = Concentración inicial del cloro (6 %).

V_2 = Volumen final de la solución (100 ml); C_2 = Concentración final de la solución (1 %).

Así por ejemplo:

$$(X) (6) = (100) (1)$$

$$X = 16.66 \text{ ml de cloro}$$

$$100 - 16.66 = 83.34 \text{ ml de agua destilada}$$

Mezclar las cantidades

2. Medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA)

Ingredientes	Cantidad
Papa.....	200 g
Agar-agar.....	20 g
Dextrosa.....	20
Agua destilada.....	1000 ml

Procedimiento. En matraz con 500 ml de agua destilada colocar los trozos de papa y cocerlos a 15 lb de presión durante 15 minutos. Después pasar por una manta de cielo, coleccionar el líquido una probeta y aforarlo a un litro. Distribuir la solución en partes iguales en dos matraces (500 ml c/u). previamente a cada matraz agregar 10 g de Agar y 10 g de Dextrosa. Esterilizar el medio a 15 lb de presión por 15 minutos, dejar enfriar a 30 °C y vaciar en cajas de Petri.

3. Medio de cultivo Agua-Agar (A-A).

Ingredientes	Cantidad
Agar-agar.....	20 g
Agua destilada.....	1000 ml

Procedimiento. En un matraz colocar 500 ml de agua destilada y adicionar la cantidad correspondiente de agar. Esterilizar el medio a 15 lb de presión por 15 minutos, dejar enfriar a 30 °C y vaciar en cajas de Petri.

4. Medio de cultivo para identificar a las diferentes especies de *Fusarium* por coloración del medio (PDA + pulpa de papa) (Nelson *et al.*, 1983).

Ingredientes	Cantidad
Papa.....	250 g
Agar-agar.....	20 g
Dextrosa.....	20
Pulpa de papa.....	½ tasa
Agua destilada.....	1000 ml

Procedimiento. Las papas se lavan perfectamente y se rebanan sin quitar la cáscara, éstas se colocan en un matraz con 500 ml de agua destilada y se meten a la autoclave por 15 minutos a 15 lb de presión. Paralelamente se licuan 20 g de Agar en 500 ml de agua destilada. El caldo de las papas se pasa

a través de varias capas de gasa y se mezclan con el Agar licuado. Los trozos de papa se enrollan en varias capas de gasa y se presionan hasta obtener la cantidad de pulpa necesaria y se agrega al matraz, agregar también 20 g de dextrosa y se afora a un litro. El medio se mezcla uniformemente y se vierte en tubos de ensaye (no dejar de agitar el medio). Los tubos se meten a la autoclave por 20 minutos a 15 lb de presión durante 15 minutos, después los tubos se ponen a enfriar en declive. Al final, en el fondo de cada tubo se observa un precipitado de la pulpa de la papa.

5. Concentrado Czapek

Ingredientes	Cantidad
NaNO ₃	30 g
KCl.....	0.5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0.5 g
FeSO ₄ .7H ₂ O.....	0.1 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O.....	0.1 g
CuSO ₄ .7H ₂ O.....	0.05 g
Agua.....	100 ml

El concentrado de Czapek se mantiene indefinidamente sin esterilización, la precipitación de Fe(OH)₃ que se forma por el almacenamiento, se resuspende agitándolo antes de su uso.

6. Medio de cultivo Czapek Extracto de Levadura Agar (CYA)

Ingredientes	Cantidad
K ₂ HPO ₄	1 g
Concentrado de Czapek.....	10 ml
Extracto de levadura en polvo.....	5 g
Sucrosa.....	30 g
Agar.....	15 g
Agua destilada.....	1000 ml

Procedimiento. En un matraz colocar 500 ml de agua destilada y adicionar la cantidad correspondiente de cada ingrediente. Esterilizar el medio a 15 lb de presión por 15 minutos, dejar enfriar a 30 °C y vaciar en cajas de Petri.

7. Extracto de Malta Agar (MEA)

Ingredientes	Cantidad
Extracto de malta en polvo.....	20 g
Peptona.....	1 g
Glucosa.....	20 g
Agar.....	20 g
Agua destilada.....	1000 ml

Procedimiento. En un matraz colocar 500 ml de agua destilada y adicionar la cantidad correspondiente de cada ingrediente. Esterilizar el medio a 15 lb de presión por 15 minutos, dejar enfriar a 30 °C y vaciar en cajas de Petri.