



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA
POSGRADO EN PROTECCIÓN VEGETAL



**PATOGÉNESIS Y CARACTERIZACIÓN DE ESPECIES DE
Fusarium ASOCIADAS AL “AMARILLAMIENTO O MADUREZ
PREMATURA” DE TRIGO (*Triticum aestivum*).**

TESIS

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

MAESTRA EN CIENCIAS EN PROTECCION VEGETAL



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

PRESENTA:

ANA EUGENIA RANGEL CASTILLO

Chapingo, Texcoco, Edo. de México, Junio de 2015



La presente tesis titulada PATOGÉNESIS Y CARACTERIZACIÓN DE ESPECIES DE *Fusarium* ASOCIADAS AL “AMARILLAMIENTO O MADUREZ PREMATURA” DE TRIGO (*Triticum aestivum*) realizada por ANA EUGENIA RANGEL CASTILLO bajo la dirección del comité asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

DIRECTOR: 
DR. HECTOR LOZOYA SALDAÑA

ASESOR: 
DRA. ERNESTINA VALADEZ MOCTEZUMA

ASESOR: 
DR. SANTOS GERARDO LEYVA MIR

ASESOR: 
DR. LUIS ANTONIO MARISCAL AMARO

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, (CONACYT) por el financiamiento de mis estudios.

A la Universidad Autónoma Chapíngo, por permitirme formar parte de tan honorable institución.

Al Dr. Héctor Lozoya Saldaña, por su gran apoyo, amistad y por que fue gran guía durante mi estancia en el postgrado.

A la Dra. Ernestina Valadez Moctezuma, por su comprensión, amistad y buenos consejos los que ayudaron a que este trabajo tomara forma.

Al Dr. Nahúm Marbán Mendoza, quien siempre brindó su amistad y apoyo cuando las circunstancias fueron complicadas.

Al Dr. Luis Antonio Mariscal, quien fue el que inspiro este trabajo de investigación.

Al Dr. Santos Gerardo Leyva, por sus aportaciones y sus conocimientos.

A mis queridos doctores Claudia, Samir y Anselmo, gracias por todo su apoyo, su amistad y buenos consejos.

A Lolita y Sr. Alberto, también contribuyeron con su granito de arena para que este trabajo se consolidara.

A Karina, Abraham y Remis, porque su ayuda fue de gran valor.

DEDICATORIAS

A los dos motores de mi vida y mis amores, Abraham y Matías, siempre han sido mi motivación, este trabajo también les pertenece.

A mis cómplices de aventuras y batallas, Lupita, Michell y Nelson, nos conocimos como compañeros y terminamos como familia.

A mis padres y hermanas, gracias por todo su amor y su impulso, todo lo que soy es gracias a ustedes, los amo.

DATOS BIOGRÁFICOS

Ana Eugenia Rangel Castillo nació el 4 de Julio de 1984, en el municipio de Celaya, Guanajuato.

Inició sus estudios de Licenciatura en su ciudad natal en el año del 2003, en el Instituto Tecnológico de Roque, se graduó en el año de 2007, obteniendo el título de Ingeniera Agrónomo, con especialidad en sistemas alternativos de producción.

Se desempeñó como asistente en el laboratorio de fitopatología del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuaria, campo experimental Bajío.

En el año 2013 inicia sus estudios de postgrado en la maestría en Protección Vegetal, de la Universidad Autónoma Chapingo

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	vi
INDICE DE CUADROS	x
INDICE DE FIGURAS	xii
Resumen	xiv
Abstract	xiv
I INTRODUCCION	1
1.1 Objetivo general	2
1.2 Objetivos específicos	2
1.3 Hipótesis	2
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 Origen y distribución de trigo	3
2.2 Importancia del cultivo de trigo.....	4
2.2.1 Importancia a nivel mundial	4
2.2.2 Importancia nacional.....	5
2.3 Principales enfermedades fungosas que atacan al cultivo de trigo	7
2.4 El amarillamiento o madurez prematura	10
2.4.1 Antecedentes de la enfermedad en el Bajío.	11
2.4.2 Síntomas de la enfermedad.....	11

2.4.3 Condiciones que favorecen a la enfermedad.....	12
2.4.4 Efecto de la temperatura y distribución de las especies en la incidencia de la enfermedad.....	13
2.5 <i>Fusarium</i>	14
2.5.1 Clasificación taxonómica (Zhang <i>et al.</i> , 2006)	15
2.5.2 Ciclo de vida	16
2.5.3 Clima y distribución de las especies de <i>Fusarium</i>	17
2.6 Métodos para detectar variación genética	18
2.6.1 Marcadores morfológicos y fisiológicos	18
2.6.2 Marcadores moleculares.....	19
2.6.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	20
2.6.4 Espaciadores internos transcritos (ITS = Internal Transcribed Spacer)...	20
2.6.5 Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP = Restriction Fragment Length Polymorphism).....	21
2.6.6 ISSR (Inter Simple Sequence Repeats).....	22
2.6.7 Secuenciación	24
III. MATERIALES Y MÉTODOS	25
3.1 Ubicación del área de trabajo y muestreo	25
3.2 Aislamiento de microorganismos (adaptado de French y Hebert, 1982).....	26
3.3 Purificación (adaptado de French y Hebert, 1982).....	26

3.4 Caracterización e Identificación morfológica	27
3.5 Técnicas moleculares	28
3.5.1 Extracción de DNA método CTAB 2% y acetato de sodio (adaptado de Doyle y Doyle, 1987; Weising <i>et. al.</i> , 2005)	28
3.5.2 Cuantificación y calidad del DNA	29
3.5.3 Gel de agarosa	29
3.5.4 Amplificación región ITS con PCR	30
3.5.5 RFLPs	31
3.5.6 ISSRs (Inter Sequence Simple Repeats)	31
3.5.7 Gel de acrilamida	32
3.5.8 Bioestadística: codificación de geles y dendogramas	33
3.5.9. Proceso de secuenciación	34
3.5.9.1 Amplificación del gen de factor de elongación y traducción (TEF) ..	34
3.5.9.2 Limpieza de las amplificaciones	35
3.5.9.3 Secuenciación	36
3.5.9.4 Análisis de secuencias	37
3.6 Prueba de patogenicidad	37
3.6.1 Inoculación y siembra	39
3.6.2 Evaluación del experimento	39
3.6.3 Análisis de datos	41

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
4.1 Aislamiento de microorganismos	42
4.2 Purificación	42
4.3 Caracterización morfológica.....	43
4.4 Cuantificación y calidad de DNA	44
4.5 Amplificación región ITS con PCR	45
4.6 RFLPs	46
4.7 ISSRs.....	53
4.8 Prueba de patogenicidad	58
4.8.1 Evaluación de altura de planta.....	58
4.8.2 Evaluación de longitud de raíz	58
4.8.3 Evaluación de severidad de la enfermedad	61
4.9 Resultados de secuenciación	63
4.10 Discusión general.....	66
V. CONCLUSIONES	68
LITERATURA CITADA.....	69
APENDICE	76

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Principales enfermedades de origen fúngico del trigo.	9
Cuadro 2. Localización de los sitios de muestreo.	25
Cuadro 3. Reactivos utilizados para la reacción PCR-ITS.	30
Cuadro 4. Enzimas de restricción utilizadas para la técnica PCR-RFLP.....	31
Cuadro 5. Reactivos utilizados para la reacción de PCR-ISSR.....	32
Cuadro 6. Preparación para una placa de 60 mL (Valadez, <i>et. al.</i> , 2000).	33
Cuadro 7. Secuencias de los iniciadores que amplifican el gen TEF.	34
Cuadro 8. Reactivos utilizados en la mezcla de reacción.	35
Cuadro 9. Reactivos utilizados en la mezcla de reacción para secuenciación.....	36
Cuadro 10. Tratamientos evaluados en la prueba de patogenicidad.	38
Cuadro 11. Escala de daño para evaluar el daño por <i>Fusarium</i> en sistema radical.	40
Cuadro 12. Número de microorganismos obtenidos de la siembra de tejido de trigo.	42
Cuadro 13. Comparación de medias con Tukey ($\alpha= 0.05$) de la altura de planta..	59
Cuadro 14. Comparación de medias con Tukey ($\alpha=0.05$) de la longitud de raíz...60	
Cuadro 15. Comparación de medias con Tukey ($\alpha=0.05$) de la severidad de la enfermedad.	62
Cuadro 16. Identidad de los organismos secuenciados.	64
Cuadro 17. Análisis de varianza efectuado a la altura de planta, con el programa SAS versión 8.....	76

Cuadro 18. Análisis de varianza efectuado a la longitud de raíz, con el programa SAS versión 8.....	76
Cuadro 19. Análisis de varianza de la severidad de la enfermedad con el programa SAS versión 8.....	77

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales cultivos sembrados en el mundo (FAOSTAT, 2015).....	4
Figura 2. Principales países productores de trigo (FAOSTAT, 2015).....	5
Figura 3. Principales cultivos sembrados en México (FAOSTAT, 2015).	6
Figura 4. Etapas donde atacan las diversas plagas y enfermedades en el ciclo del cultivo (CESAVEG, 2010).....	10
Figura 5. Ciclo de vida de <i>Fusarium</i> en trigo. Fuente: APS (2015).	16
Figura 6. Sintomatología de la escala de daño.	40
Figura 7. Estructuras de <i>Fusarium</i> sp., observadas al microscopio. a, b, c, d) macroconidios en forma de canoa y microconidios. e) clamidosporas. f) conidióforos.	43
Figura 8. Diferentes coloraciones en algunas de las cepas de <i>Fusarium</i>	44
Figura 9. Gel de agarosa con los fragmentos amplificados de la región ITS. La flecha señala el marcador de 1000 pares de bases.	45
Figura 10. Perfiles obtenidos con la enzima <i>Hha</i> I, las bandas esperadas se ubican dentro del recuadro en rojo. Las flechas de color resaltan un tipo de polimorfismo.	46
Figura 11. Perfiles obtenidos con la enzima <i>Hae</i> III, las bandas esperadas se ubican dentro del recuadro en rojo. Las flechas de color resaltan un tipo de polimorfismo.	47

Figura 12. Perfiles obtenidos con la enzima <i>Hinf</i> I, las bandas esperadas se ubican dentro del recuadro en rojo. Las flechas de color resaltan un tipo de polimorfismo.	47
Figura 13. Dendograma generado a partir de los cortes realizados con la enzima <i>Hha</i> I.	49
Figura 14. Dendograma generado a partir de los cortes realizados con la enzima <i>Hae</i> III.	50
Figura 15. Dendograma generado a partir de los cortes realizados con la enzima <i>Hinf</i> I.	51
Figura 16. Dendograma creado con la información de los cortes con las enzimas <i>Hha</i> I, <i>Hae</i> III y <i>Hinf</i> I, en el cual, se generaron 15 agrupamientos al haber realizado un corte con una perpendicular.	52
Figura 17. Perfiles obtenidos con el iniciador (AC)8YG, dentro del recuadro rojo se encuentran las bandas tomadas en cuenta para el análisis. En el recuadro azul se aprecia un perfil de bandas semejante.	54
Figura 18. Perfiles obtenidos con el iniciador AC(GACA) ₄ , en el recuadro rojo se encuentran las bandas tomadas en cuenta para el análisis.	54
Figura 19. Dendograma generado con el primer (AC)8YG.	55
Figura 20. Dendograma generado con el primer AC(GACA) ₄ .	56
Figura 21. Dendograma generado a partir de los primers (AC)8YG y AC(GACA) ₄ , al realizar un corte transversal se distinguen 14 grupos.	57
Figura 22. Árbol filogenético generado a partir de las cepas secuenciadas de <i>Fusarium</i> sp.	65

**PATOGÉNESIS Y CARACTERIZACIÓN DE ESPECIES DE *Fusarium* ASOCIADAS AL
“AMARILLAMIENTO O MADUREZ PREMATURA” DE TRIGO (*Triticum aestivum*).**

**PATHOGENESIS AND CHARACTERIZATION *Fusarium* SPECIES ASSOCIATED WITH
"YELLOWING OR MATURITY EARLY" OF WHEAT (*Triticum aestivum*).**

¹Rangel Castillo Ana Eugenia y ²Lozoya Saldaña Héctor

Resumen

La madurez prematura del trigo es una enfermedad causada por un complejo de hongos del género *Fusarium*, la cual ataca a la semilla, raíz, tallo y espiga. El objetivo fue evaluar y caracterizar la patogenicidad de las especies de *Fusarium* asociadas al amarillamiento o madurez prematura en el cultivo de trigo. Se realizaron muestreos de plantas con síntomas de la enfermedad en el estado de Guanajuato. Se aislaron y purificaron por cultivo monospórico los hongos presentes en raíz, tallo y espiga. Los microorganismos se identificaron mediante las técnicas RFLPs e ISSRs. Como resultado se obtuvieron 116 aislamientos del género *Fusarium*. Los RFLPs arrojaron 16 agrupamientos, de los cuales se utilizó un organismo de cada grupo para hacer pruebas de patogenicidad en semilla de trigo variedad Cortázar S94. Con base al resultado de los ISSRs se seleccionaron 30 cepas que se secuenciaron y se construyó un árbol filogenético.

Palabras clave adicionales: ISSRs, RFLPs, *Fusarium*, patogenicidad, árbol filogenético.

Abstract

The wheat early maturity of is a disease caused by a complex of *Fusarium*, which attacks seed, root, stem and spike. The objective of this study was to evaluate and to characterize the *Fusarium* species pathogenicity associated with the early maturity of wheat. Plant samples with symptoms of the disease in the state of Guanajuato were collected. Fungi present in root, stem and spike were isolated and purified by single-spore culture. The microorganisms were identified by RFLPs and ISSRs techniques. As a result, 116 *Fusarium* isolations were obtained. The result of RFLP yielded 16 clusters, one isolate from each group was used to test pathogenicity in Cortázar S94 wheat seed variety. Thirty strains based on the result of the ISSRs were selected to be sequenced and a phylogenetic tree was constructed.

Additional key words: ISSRs, RFLPs, *Fusarium*, pathogenicity, phylogenetic tree.

¹Tesista

²Director

I INTRODUCCION

El cultivo de trigo es uno de los más importantes para el consumo humano, ocupa el cuarto lugar en producción a nivel mundial. Su valor nutricional es muy importante y se encuentra presente en la dieta básica de millones de personas alrededor del mundo. Existen diversas variedades de trigo que han sido desarrolladas para poder ser cultivadas en diferentes regiones y bajo diferentes condiciones agroclimáticas. Todo esto propicia que el cultivo este expuesto a una amplia gama de plagas y enfermedades, mermando así, la calidad y producción. En México, el trigo ha sido sembrado desde que los españoles lo introdujeron en el siglo XVI, y desde entonces, el Bajío se había mantenido como una de las regiones productoras más importantes del país, hasta mediados del siglo pasado. Desde el año 2000 se ha reportado la enfermedad conocida como “amarillamiento y madurez prematura” en el cultivo de trigo, dentro de los municipios de Pueblo Nuevo, Salamanca, Valle de Santiago, Pénjamo, Yuriria, Irapuato y Acámbaro, en el estado de Guanajuato. Actualmente este problema se ha detectado en todo el Bajío; en campo se presenta en forma de manchones con síntomas de daño en raíz, corona y tallo; cuando se presenta en grandes extensiones puede llegar a causar pérdidas totales. Este problema se ha asociado principalmente con un complejo de especies del género *Fusarium* (Delgadillo, 2008; FAOSTAT, 2015; SARH, 1992; Villaseñor y Espitia, 2000). Es importante identificar las especies de *Fusarium*, para entender la relación que tienen entre sí en el desarrollo de la enfermedad.

Por tal motivo se plantearon los siguientes objetivos para la presente investigación.

1.1 Objetivo general

Evaluar y caracterizar la patogenicidad de las especies de *Fusarium* asociadas al amarillamiento o madurez prematura en el cultivo de trigo.

1.2 Objetivos específicos

Evaluar la patogenicidad de las especies de *Fusarium* para determinar el efecto individual o en conjunto en el desarrollo la enfermedad.

Caracterizar morfológica y molecularmente las cepas de *Fusarium* aisladas del cultivo de trigo, para identificar las especies asociadas al amarillamiento o madurez prematura.

1.3 Hipótesis

- Ho: Todos los aislados de *Fusarium* e incluso su combinación inducen el mismo síntoma en trigo.
- Ha: Al menos uno de los aislados de *Fusarium* e incluso su combinación induce síntomas en trigo.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Origen y distribución de trigo

La palabra «trigo» proviene del vocablo latino *triticum*, que significa ‘quebrado’, ‘triturado’ o ‘trillado’, haciendo referencia a la actividad que se debe realizar para separar el grano de trigo de la cascarilla que lo recubre. El trigo tiene sus orígenes en la antigua Mesopotamia. Las más antiguas evidencias arqueológicas del cultivo de trigo vienen de Siria, Jordania, Turquía e Irak. Existen hallazgos de restos carbonizados de granos de trigo almidonero (*Triticum dicoccoides*) y huellas de granos en barro cocido en Jarmo (Irak septentrional), que datan del año 6700 a.C. (SARH, 1992, Villaseñor y Espitia, 2000).

Los españoles introdujeron el trigo a México en el siglo XVI a principios de la década de los veinte, poco después de su llegada. No obstante, el maíz que ya era cultivado extensamente por los indígenas cuando llegaron los españoles, el trigo se mantuvo como el único cereal para elaboración de pan. Esa cualidad le permitió ampliar el área sembrada durante los siglos XVII al XIX, debido a que la demanda de su grano por la población, sobre todo de origen europeo, se incrementó con el paso del tiempo. Fue así como las áreas temporaleras de los Valles Altos de México y de la región del Bajío se convirtieron en la principal zona productora de trigo durante el tiempo de la colonia. Es un alimento de gran

importancia en el mundo, como fuente de carbohidratos, proteínas, vitaminas y minerales. El 20% de las calorías alimenticias en el mundo provienen del trigo y es un alimento básico para más de 1000 millones de personas en el mundo (SARH, 1992, Villaseñor y Espitia, 2000).

2.2 Importancia del cultivo de trigo

2.2.1 Importancia a nivel mundial

De acuerdo a la FAOSTAT (2015), el trigo es el cuarto cultivo que se siembra a nivel mundial, tan solo por detrás de los cultivos de caña de azúcar, maíz y arroz (Figura 1).

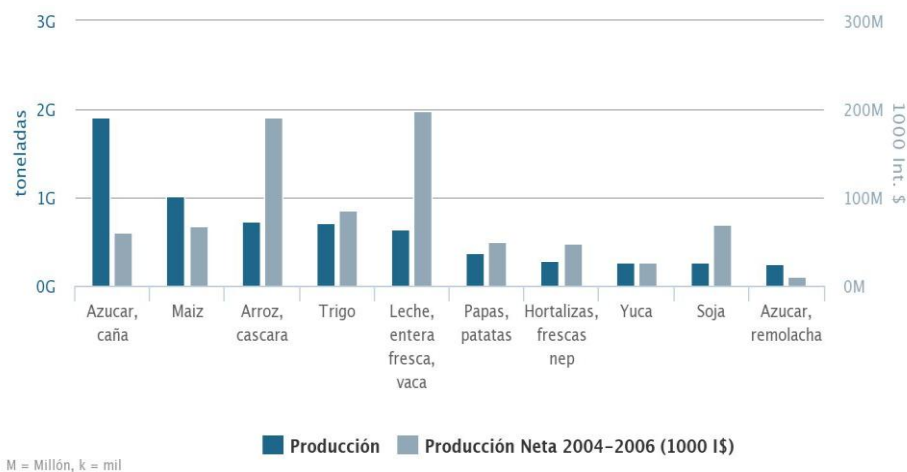


Figura 1. Principales cultivos sembrados en el mundo (FAOSTAT, 2015).

El principal país productor de trigo en el 2013 fue China, con una producción de 121, 926,400.00 t, el segundo lugar lo tuvo India con una producción de 93,

10,000.00 t (Figura 2). México ocupó el lugar número 31, con una producción de 3,357,307.00 t. (FAOSTAT, 2015).

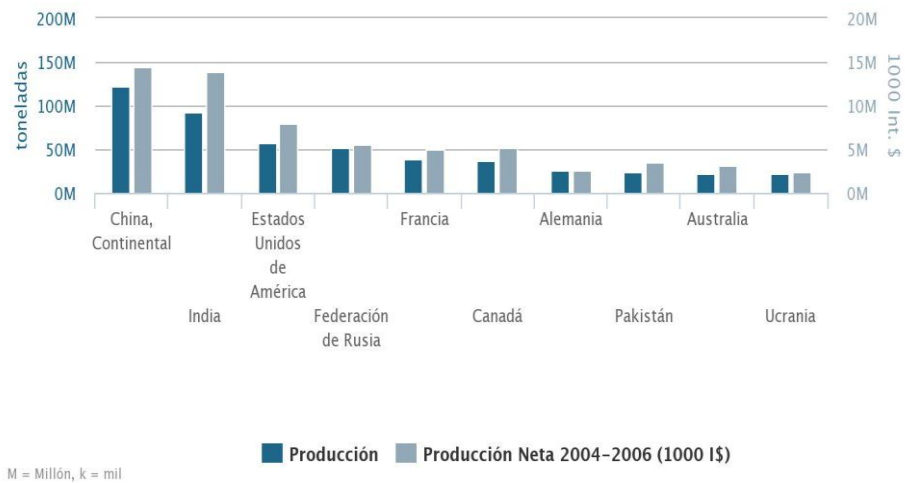


Figura 2. Principales países productores de trigo (FAOSTAT, 2015).

En el año 2013 la FAOSTAT (2015) registró una producción total de 715,909,258.46 t.

2.2.2 Importancia nacional

En el año 2013, el trigo ocupó el quinto lugar de importancia de acuerdo a producción en toneladas en el país (Figura 3).

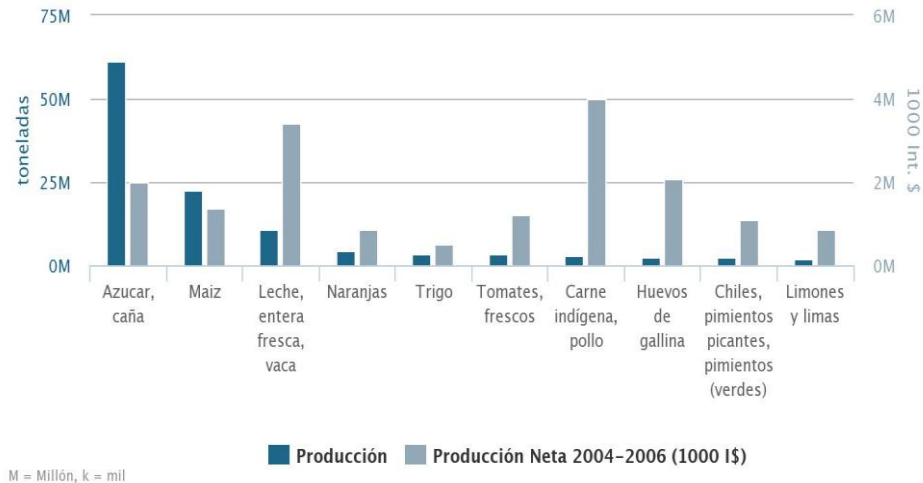


Figura 3. Principales cultivos sembrados en México (FAOSTAT, 2015).

De acuerdo a datos del Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), en el 2013 la producción del trigo en México fue de 3, 357,306.90 t, con una superficie sembrada de 683,044.42 Ha, una superficie cosechada de 634,240.99 Ha, con un rendimiento promedio de 5.29 t ha-1, además de que el valor de la producción alcanzó los 11, 923, 675, 180 pesos (SIAP, 2015).

En México los principales estados productores de trigo son Sonora, Baja California y Chihuahua. La mitad de la producción de trigo proviene de Sonora, en el año 2013, dicho estado aportó 2, 089,841.43 t, con un rendimiento de 6.86 t ha-1 (SIAP, 2015).

El estado de Guanajuato ocupó el 7º lugar en cuanto a producción nacional, con valores de 74,575.03 t, obtuvo un rendimiento promedio de 2.43 t ha-1. La

superficie sembrada fue de 55,360.20 Ha, la superficie cosechada fue de 30,626.50 Ha y el valor de la producción fue de 265,596.58 pesos (SIAP, 2015).

Dentro del estado de Guanajuato, los principales municipios productores de trigo fueron Cortázar, Dolores Hidalgo, Celaya, León y San Luis de la Paz. El municipio de Cortázar ocupó el primer lugar, con una producción de 56,035.81 t y se obtuvo un rendimiento promedio de 3.55 t ha⁻¹ (SIAP, 2015).

2.3 Principales enfermedades fungosas que atacan al cultivo de trigo

Los hongos pertenecen a reino Fungi, se distinguen de las plantas porque no tienen clorofila y, por consiguiente, carecen de la capacidad de fotosíntesis. En lugar de elaborar su propio alimento, los hongos absorben nutrientes del tejido muerto o vivo de su hospedero. Se propagan en muchas formas: pueden ser transmitidos por semillas o el suelo, o por el viento, el agua (lluvia, agua de riego), insectos, animales y el hombre (Prescott, *et al.*, 1986; Romero, 1999).

La infección por hongos patógenos depende de varios factores: por lo general se requieren la presencia de agua libre en la superficie de la planta hospedera, sensibilidad del hospedante, densidad de inóculo y cierta temperatura ambiente, además de otros factores del medio. Algunos hongos atacan sólo a una o algunas especies hospedantes, pero otros atacan a muchas. Los síntomas y el desarrollo de la enfermedad dependen de la interacción entre el parásito y el

hospedero. Los síntomas pueden ser similares o distintos según los hongos involucrados (Prescott, *et al.*, 1986; Romero, 1999).

En los cereales, los patógenos del suelo producen enfermedades asociadas con la inhibición o la destrucción del sistema radical de las plantas. Aunque resulta difícil identificar todos los problemas que estos patógenos pueden provocar, es factible agrupar estos hongos en forma general, según las zonas climáticas donde predominan. Por ejemplo, las especies de los géneros *Bipolaris*, *Fusarium* y *Pythium* son importantes en climas templados, *S. rolfsii* lo es en el subtrópico y *Gaeumannomyces graminis* prevalece en zonas frías y lluviosas. En general, los efectos de estos patógenos en la planta son un crecimiento menor, se reduce el número de macollos y se produce una madurez prematura (espigas blancas). Asimismo, se observa una distribución irregular de grupos de plantas enfermas en el campo (manchones). Las principales enfermedades del trigo se mencionan en el Cuadro 1. Los hongos fitopatógenos causan enfermedades en los cultivo, y el cultivo de trigo no es la excepción, siendo susceptible a estos dependiendo del estado fenológico (Figura 4), tipo de suelo, humedad y temperatura (Delgadillo, 2008; Gilchrist *et al.* 2005; Saunders y Hettel, 1994).

Cuadro 1. Principales enfermedades de origen fúngico del trigo.

Nombre común	Microorganismo causante
Roya de la hoja (roya café)	<i>Puccinia recóndita</i>
Roya del tallo (roya negra)	<i>Puccinia graminis f. sp. Tritici</i>
Roya lineal (roya amarilla)	<i>Puccini astriiformis</i>
Carbones comunes o carbón apestoso	<i>Tilletia caries</i> , <i>T. foetida</i> , <i>T. controversa</i>
Carbón parcial	<i>Tilletia indica</i> Sin. <i>Neovossia indica</i>
Carbón volador	<i>Ustilago tritici</i>
Carbón de bandera	<i>Urocystis agropyri</i>
Mildiú polvoriento	<i>Erysiphe graminis, sp. Tritici</i>
Tizón foliar	<i>Septoria tritici</i>
Tizón de la gluma causado	<i>Septoria nodorum</i>
Tizón	<i>Septoria avenae</i>
Tizón foliar	<i>Helminthosporium sativus</i>
Mancha amarilla de la hoja	<i>Helminthosporium tritici-repentis</i>
Manchas foliares	<i>Alternaria triticina</i>
Manchas foliares (moho blanco)	<i>Fusarium nivale</i>
Roña (tizón de la espiga)	<i>Fusarium spp.</i>
Ergot, cornezuelo	<i>Claviceps purpurea</i> ,
Punta negra del grano	<i>Alternaria</i> , <i>Helminthosporium</i> y <i>Fusarium spp.</i>
Mildiú vellosa	<i>Sclerophthora macrospora</i>
Mal del pie	<i>Gaeumannomycesgraminis f. sp. Tritici</i>
Mancha ocular	<i>Cercospora herpotrichoides</i>
Mancha ocular y pudrición de la raíz	<i>Rhizoetonia solani</i>
Pudrición común de la raíz y de la corona	<i>Helminthosporium</i> , <i>Fusarium</i> y <i>pythium spp.</i>
Marchitez de los cereales tizón sureño	<i>Sclerotium rolfsii</i>

Fuente: Gilchrist *et al.* 2005; Prescott, *et al.*, 1986; Wiese, 1987; Wilcoxson y Saari, 1996.

En trigo, las infecciones por hongos del suelo no son específicas y se manifiestan como una pudrición de las raíces y de la corona, manchas en las hojas y muerte de plántulas (Delgadillo, 2008).

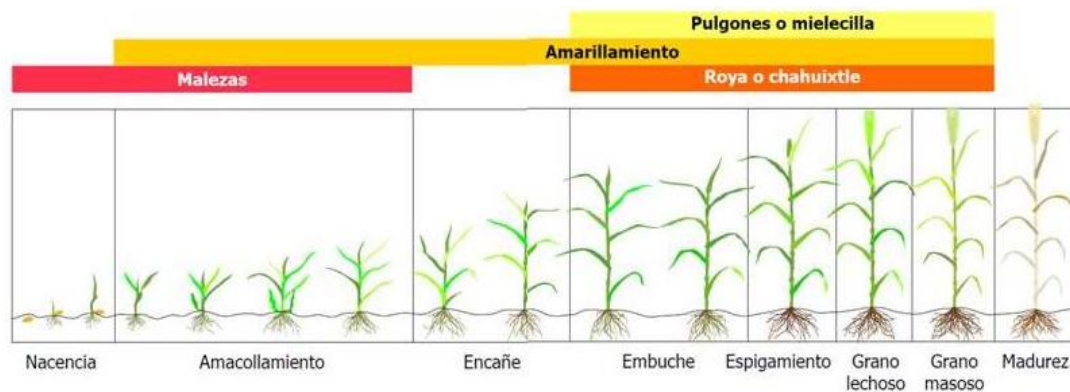


Figura 4. Etapas donde atacan las diversas plagas y enfermedades en el ciclo del cultivo (CESAVEG, 2010).

2.4 El amarillamiento o madurez prematura

El amarillamiento o madurez prematura es una enfermedad causada por una o más especies del género *Fusarium* como *F. verticillioides* (= *F. moniliforme*) (*Gibberella fujikuroi*), *F. graminearum* (*G. zeae*), entre otros. Presente en América del norte y sur, África y Asia. Ataca cereales como trigo, cebada, centeno, avena, maíz, sorgo, triticale y forrajes. Otros hospederos son frijol, soya y girasol. Las especies *F. culmorum* y *F. graminearum*, son las que principalmente están asociadas a trigos con estrés hídrico. Las especies *F. avenaceum*, *F. acuminatum*, *F. crookwellense* y *F. poae*, son menos virulentas y mayormente asociadas a las pudriciones de raíz y corona. La especie *F. graminearum* del Grupo II también se asocia a estas pudriciones. Las seis especies antes mencionadas sobreviven en el suelo y en rastrojos como clamidosporas (Delgadillo, 2008; Gilchrist et al. 2005; Saunders y Hettel, 1994; Wall, 1987).

2.4.1 Antecedentes de la enfermedad en el Bajío.

Desde el año 2000 en los municipios de Pueblo Nuevo, Salamanca, Valle de Santiago, Pénjamo, Yuriria, Irapuato y Acámbaro, en el estado de Guanajuato, se ha presentado la enfermedad conocida como “amarillamiento o madurez prematura” en trigo. Actualmente esta enfermedad continúa diseminándose por todas las zonas trigueras del Bajío. En el 2006-2008, el INIFAP-CEBAJ realizó una investigación de surgimiento de la enfermedad en áreas productoras de cebada y trigo en el estado de Guanajuato, donde se logró aislar a *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia sp.*, y con mayor frecuencia al hongo *Fusarium spp.*, donde se identificaron las especies; *F. subglutinans*, *F. proliferatum*, *F. oxysporum* y *F. acuminatum* (CESAVEG, 2010; Delgadillo, 2008).

2.4.2 Síntomas de la enfermedad

En general, los efectos son: baja germinación de semilla, crecimiento menor en la planta, reducción y muerte de macollos y se produce una madurez prematura (espigas blancas); en algunos casos la planta no llega a producir espiga, se queda vana o con grano chupado; las plantas se dañan en la raíz, corona y tallo por pudriciones. Así mismo, se observa una distribución irregular de grupos de plantas enfermas en el campo (manchones) y cuando se presenta en grandes extensiones causa pérdidas totales para el productor (CESAVEG, 2010; Delgadillo, 2008).

En el caso de *Fusarium spp.*, este hongo puede estar en las espigas y en la semilla; y puede atacar diferentes partes de la planta en diferentes etapas de desarrollo. Una fase severa de la enfermedad se expresa como un debilitamiento y una coloración rosada o café de la base del tallo en plantas con estrés hídrico, denominada “pudrición de la corona” asociada a zonas áridas (dryland foot rot, en inglés). La pudrición de la corona y de raíces son las principales enfermedades del trigo cuando la humedad es deficiente (Delgadillo 2008; Gilchrist *et al.*, 2005; Saunders y Hettel, 1994; Wiese, 1987).

2.4.3 Condiciones que favorecen a la enfermedad

Los rastrojos son una fuente importante de inoculo ya que pueden tener conidios, micelio, clamidosporas y ascosporas, los que pueden sobrevivir por varios años. Inviernos secos y cálidos, provocan estrés hídrico en la planta. Si dicho estrés se presenta durante la floración y llenado de grano, aunado a temperaturas altas del suelo (entre 20 – 30 °C) y temperaturas ambientales cálidas, predisponen a la planta de trigo al ataque de este complejo de especies. El problema se acentúa después de realizar el segundo y tercer riego, en condiciones de altas temperaturas, de esta manera las raíces mueren por falta de ventilación en el suelo y se presentan pudrición de raíz (CESAVEG, 2015; Wall, 1987; Wiese, 1987; UC, 1990).

En el Bajío las siguientes prácticas agronómicas usuales predisponen al cultivo al ataque de hongos del suelo que causan pudriciones de raíz, corona, tallo y muerte en preemergencia:

- El monocultivo de cereales
- Rotación de un cereal con otro cereal
- Permanencia del rastrojo en el terreno (labranza de conservación)
- Aplicación de riegos pesados
- Mala nivelación del terreno
- Fertilizaciones con dosis mayores a 50 t ha⁻¹.

Otros factores que interviene son el suelo predominante en la región el cual es tipo vertisol, rico en arcillas; además del tipo de clima que va del templado al semi seco (Fernández y Conner, 2011; CESAVEG, 2015; Delgadillo, 2008; Wayne, 2008).

2.4.4 Efecto de la temperatura y distribución de las especies en la incidencia de la enfermedad

Debido a que los síntomas de “la madurez prematura” son el resultado de un complejo de especies de *Fusarium*, la relación entre la temperatura y la incidencia de la enfermedad no es tan simple del todo. Por ejemplo, la ocurrencia de la pudrición de la corona, causada por un complejo de *Fusarium* en el Reino Unido esta normalmente asociada con climas cálidos y altas

incidencias de la enfermedad con brotes dispersos de síntomas severos que han sido reportados en años cálidos. Pero además, altas incidencias de la enfermedad fueron reportadas en años fríos tanto como en años cálidos (Pettitt y Parry, 2001).

2.5 *Fusarium*

El género *Fusarium* fue descrito por Link (1809) para las especies con esporas fusiformes no septadas nacidas en un estroma y se basó en *Fusarium roseum*. A diferencia de algunos otros hongos, no está claro cuál es el centro de origen de *Fusarium*. La diversidad de las especies de *Fusarium* y sus telemorfos sugieren que es un antiguo grupo que probablemente apareció bastante temprano en la evolución de los Ascomicetos. De cualquier forma, no hay registros fósiles que sustenten esto. Representantes del género han sido encontrados en áreas del sub antártico, anteriormente al círculo ártico, así que las especies de *Fusarium* probablemente se dispersaron a todos los continentes antes de la aparición de la actividad humana (Backhouse *et al.*, 2001). Los microconidios y las clamidosporas terminales o intercalares pueden estar presentes o ausentes. El estado peritecial cuando se conoce, pertenece a los Hipocreales. Las especies de *Fusarium* están ampliamente distribuidas en el suelo y en sustratos orgánicos y han sido aislados desde las capas gruesas de hielo en el Ártico hasta la arena del Sahara (Booth, 1971).

El anamorfo *Fusarium* (fase asexual) posee macroconidios (esporas asexuales) que se derivan de células productoras de conidios llamados fiálides. Las fiálides se agrupan en formato de masas conocido como esporodoquios. Los macroconidios son hialinos, en forma de canoa, por lo general con tabiques. El micelio es extensivo y algodonoso en medio de cultivo, frecuentemente con pigmentaciones rosa, morado o amarillo (APS, 2015).

2.5.1 Clasificación taxonómica (Zhang *et al.*, 2006)

Reyno: Eumycota

Phyllum: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Subclase Hypocreomycetidae

Orden: Hypocreales

Familia: Nectriaceae,

Género: *Giberella* (anamorfo *Fusarium*).

Dentro del género *Fusarium* las especies que más se conocen son: *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. poae*, *F. semitectum*, *F. sporotrichioides* y *F. tricinctum*, las cuales se han encontrado en cereales; *F. nygamai*, *F. subglutinans* y *F. verticilloides* en maíz; *F. thapsinum* y *F. chlamydosporum* en sorgo; mientras que *F. nygamai* y *F. fujikuroi* se hallan en arroz. En legumbres se observan *F. chlamydosporum* y *F. tumidum*; y en papa *F. solani*. Las especies *F. acuminatum*, *F. equiseti*, *F. oxysporum*, *F.*

proliferatum, *F. sambucinum* y *F. solani* se encuentran en diversos sustratos. sin mencionar otras especies que se encuentran como saprófitos del suelo (Booth, 1971; Delgadillo 2008; Leslie y Summerell, 2006; Nelson *et al.*, 1983).

2.5.2 Ciclo de vida

Fusarium spp., sobrevive el invierno en los residuos de cosecha infectados (tallos, paja de trigo y otros hospederos) (Figura 5). En éstos, el hongo produce esporas asexuales (macroconidios) que se difunden hacia las semillas, plantas u otros desechos por salpicadura de la lluvia o el viento. En condiciones de calor y alta humedad, el estado sexual del hongo se desarrolla en desechos infectados. Forma peritecios en la superficie de estos residuos, se liberan las esporas sexuales (ascosporas) en el ambiente (estas ascosporas, se dispersan por el viento, se puede propagar a través de largas distancias) (APS, 2015).

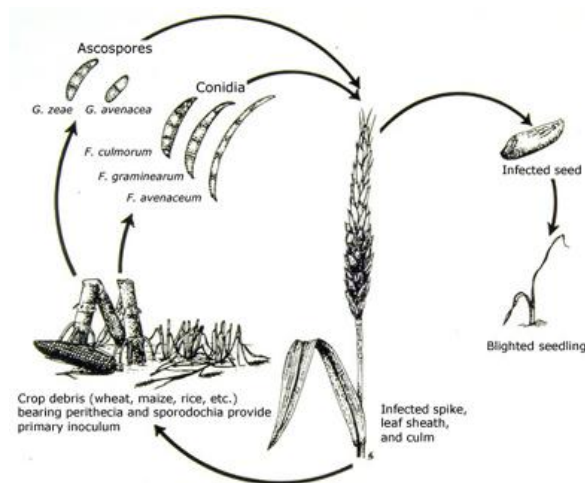


Figura 5. Ciclo de vida de *Fusarium* en trigo. Fuente: APS (2015).

2.5.3 Clima y distribución de las especies de *Fusarium*

En una escala local, los factores tales como tipo de suelo y microambiente, la tierra que se usa y el tipo de vegetación tendrán una gran influencia. Muchas especies de *Fusarium* aparecen para tener distribuciones controladas por el clima. La relación entre el clima y la distribución han sido típicamente expresadas en términos cualitativos. Por ejemplo una especie dada puede estar presente en áreas más cálidas o húmedas, o tener una distribución tropical. Podemos decirlo de dos maneras: mediante la búsqueda de descripciones cuantitativas de la distribución climática, y vinculando estas a aspectos cuantitativos de la biología de los hongos. Por ejemplo, es típico que *F. culmorum* y *F. avenaceum* se encuentren en climas más fríos, húmedos y marítimos; mientras que *F. graminearum* y *F. pseudograminearum* se encuentran en climas más cálidos y continentales. A nivel del organismo, la persistencia en un área en particular dependerá del balance entre la supervivencia, la colonización competitiva de substrato y la reproducción. Cada uno de estos estará afectado por la temperatura y el agua. A grandes rasgos, la distribución de las especies patogénicas esta obviamente ligada a la distribución de sus hospedantes (Backhouse *et al.*, 2001; Booth, 1971).

2.6 Métodos para detectar variación genética

Las estrategias clásicas para el estudio de la variabilidad genética tales como anatomía comparativa, morfología, embriología fisiología se han visto complementadas de gran manera por las técnicas moleculares. Los “marcadores moleculares”, están basados en los polimorfismos encontrados en proteínas o DNA (Doyle y Doyle, 1987; González y Simpson, 1997).

2.6.1 Marcadores morfológicos y fisiológicos

Las características morfológicas se han usado para estimar los niveles de variabilidad, ya que permiten determinar la respuesta a la selección y su fondo genético. Los criterios morfológicos pueden ser evaluados en cualquier etapa del ciclo de vida. La diversidad genética puede ser evaluada en hongos con la observación de diferentes características morfológicas como por ejemplo: nivel de organización celular, características de talo, características del micelio como tamaño, forma, septo, situación, aspecto, color, consistencia, función, etc. Algunos de los caracteres son bastante estables, pero la gran mayoría son muy variables, ya que son fuertemente influenciados por el ambiente por lo que muchas clasificaciones son ambiguas y poco confiables provocando divergencia entre investigadores, además, es frecuentemente difícil encontrar suficientes marcadores morfológicos para realizar un estudio de variabilidad confiable (Flores *et al.*, 1997; González y Simpson, 1997).

2.6.2 Marcadores moleculares

Se usan principalmente para detectar variabilidad genética y cambios en el genoma, o para detectar la estructura de poblaciones en animales, plantas y microorganismos. Permiten estudiar el origen y distribución de razas dentro, facilitando la identificación de genes de interés y la construcción de mapas génicos. Existen dos tipos de marcadores los proteínicos y de DNA (Flores *et al.*, 1997). El nivel de variación que detectan difiere considerablemente entre ellos; sin embargo, presentan varias ventajas con respecto a los marcadores morfológicos, algunas de ellas son (González y Simpson, 1997):

- Se pueden emplear en cualquier tipo de organismo.
- Presentan una herencia del tipo Mendeliano.
- Algunos son codominantes (lo cual permite discriminar los estados homo- y heterocigotes en organismos diploides).
- En lo general se pueden detectar alto grado de polimorfismo.
- Son detectados en todo tipo de tejidos y en todos los estados de desarrollo.
- Son abundantes y están distribuidos en todo el genoma.
- Son selectivamente neutros (no tienen efectos pleiotrópicos, letales, etc.)
- Son de fácil acceso.
- Procedimientos fáciles y rápidos.
- Alta reproducibilidad.
- Fácil intercambio de datos entre laboratorios.

2.6.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Este es uno de los métodos moleculares de mayor eficiencia porque es rápida y versátil en el diagnóstico de enfermedades vegetales. La mezcla de PCR ésta compuesta de: la muestra a analizar (DNA blanco), agua, amortiguadores, sales, nucleótidos, iniciadores o primers (pequeños oligonucleótidos de DNA) y DNA polimerasa termoestable. Esta técnica consiste en la amplificación exponencial de secuencias específicas de DNA. Se siguen tres etapas dentro de un ciclo, cada una caracterizada por una temperatura y duración específica, las cuales son: desnaturalización (94 °C), alineamiento (entre 55 y 60 °C) y extensión (72 °C) (Flores *et al.*, 1997; Martínez y Alvarado, 1997; Valadez y Kahl, 2005).

2.6.4 Espaciadores internos transcritos (ITS = Internal Transcribed Spacer)

Los espaciadores internos transcritos o ITS consisten en dos regiones variables no codificantes de aminoácidos llamadas ITS1 e ITS2; están localizadas entre los genes del RNA ribosómico 18S y 5,8S y entre el 5,8S y 28S respectivamente las cuales se transcriben y se emplean para la distinción entre especies de hongos filamentosos y han desarrollado sondas o iniciadores específicos para la detección y diferenciación de hongos. La región ITS tiene un tamaño de aproximadamente 600 pb (Flores *et al.*, 1997; González, 2009; Ramírez, 2013).

Los ribosomas son estructuras responsables de la síntesis proteica, es decir de la traducción del código genético. Están hechos por el 65% de RNA ribosomal (rRNA) y 35% de proteínas. El RNA ribosomal esta codificado por la porción de DNA nuclear llamada DNA ribosomal. Una de las regiones más empleadas actualmente para la distinción entre especies de hongos, es la del DNA ribosomal (rDNA). Los genes que codifican para rRNA en eucariotas están repetidos en grupos con varios cientos de copias por genoma. Cada copia consiste en regiones altamente conservadas intraespecíficamente, pero variable entre diferentes especies. Estas regiones generan un importante polimorfismo también dentro de la misma entidad taxonómica, en particular para los géneros y la especie (Eguiarte *et al.*, 2007; Flores *et al.*, 1997; González, 2009; Ramírez, 2013).

2.6.5 Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP = Restriction Fragment Length Polymorphism)

Los marcadores de DNA son secuencias genómicas localizadas en un mismo *locus* pero que difieren en su secuencia de bases nitrogenadas. Estas variaciones son consecuencia de varios eventos de mutaciones (sustituciones simples de pares de bases, adiciones o deleciones, o cambios cromosómicos de gruesos como inserciones o traslocaciones) que se manifiestan en los genomas que se comparan. Para detectar algunas de estas mutaciones se utiliza la técnica de RFLPs, expresa diferencias en sitios específicos del DNA que fueron reconocidos por enzimas de restricción particulares

(endonucleasas). Los patrones producidos por las enzimas de restricción se obtienen de una sola región genómica, previamente amplificada con primers o iniciadores específicos. Cada una de las endonucleasas, cuyo origen es bacteriano, reconocen y cortan solamente una secuencia específica de bases nitrogenadas en el DNA. El DNA es reconocido y cortado en fragmentos de longitud definida; cualquier mutación dentro de esos sitios, podría cambiar el patrón del fragmento y permitir que se detecte un RFLP al comparar dos o más genomas. Los fragmentos resultantes se separan en un gel de agarosa o poliacrilamida, para después teñirse con bromuro de etidio o sales de plata. Dependiendo de la región amplificada, su tamaño o nivel de variabilidad se aplica para la diferenciación de cepas o linajes a nivel intraespecífico, o entre especies o géneros. En el caso de hongos filamentosos, se ha empleado para distinguir especies del género *Fusarium* (Eguiarte *et al.*, 2007; Flores *et al.*, 1997; González, 2009; Valadez y Kahl, 2005).

2.6.6 ISSR (Inter Simple Sequence Repeats)

La técnica de Secuencias Internas Simples Repetidas (ISSR), utiliza un solo iniciador que consiste en repeticiones de di o trinucleótidos abundantes en el genoma. Los iniciadores ISSRs son ligeramente mayores que otros (16-20 pares de bases) por lo que pueden alinearse mejor al DNA y mejorar la fiabilidad y reproducibilidad del sistema. Además, los ISSRs son marcadores moleculares significativamente más baratos que otros. También son

marcadores semi-arbitrarios amplificados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de la presencia de un oligonucleótido o primer complementario a un microsatélite, diseñado para unirse a los motivos repetidos de di y trinucleótidos complementario a la secuencia del microsatélite. En ocasiones es posible agregar a esta secuencia un par de nucleótidos extras arbitrarios en el extremo 3' o en el 5', que jugarán el papel de "anclas" asegurando así que la amplificación inicie siempre en el extremo 5' o en el 3' del microsatélite, respectivamente. Se ha visto que los ISSRs frecuentemente amplifican de 25 a 50 bandas en una sola reacción. Este patrón característico de productos de PCR se considera la "huella digital genética" de cada uno de los individuos analizados. El polimorfismo entre individuos de la misma población puede detectarse, ya que el análisis es sensible a la presencia/ausencia del elemento genómico reconocido por el primer y a la longitud de la secuencia intermedia amplificada. Las bandas de ISSRs son consideradas marcadores dominantes. La presencia de la banda representa el genotipo dominante (homócigo o heterócigo), mientras que su ausencia representa el genotipo homócigo recesivo. Se asume que existen dos alelos por locus. La ausencia de una banda puede deberse a varios factores: la no existencia de un sitio de unión completo al primer debido a una mutación; arreglos estructurales en el cromosoma durante la meiosis; inserciones o deleciones suficientemente grandes como para aumentar o disminuir el tamaño de la banda, de manera que se identifica como un locus diferente (Eguiarte *et al.*, 2007; Ramírez, 2013; Sánchez *et al.*, 2012).

2.6.7 Secuenciación

Los análisis más detallados de diferenciación de DNA pueden obtenerse secuenciando la región de interés para diferentes individuos. Generalmente la secuenciación es un procedimiento relativamente fácil, gracias a desarrollo de equipos automatizados de electroforesis capilar. Estos producen una serie de moléculas que difieren en longitud por un nucleótido, indicando mediante fluorescencia la última base modificada adicionada en la cadena, con la cual se determina la secuencia del fragmento original (Eguiarte *et al.*, 2007; Ramírez, 2013).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación del área de trabajo y muestreo

El muestreo se realizó en el ciclo otoño-invierno del año 2012 en el estado de Guanajuato (Cuadro 2). El aislamiento de los patógenos se realizó en el Laboratorio de Fitopatología de Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Experimental Bajío (CEBAJ), Celaya, Guanajuato, México. La purificación de los hongos se realizó en el laboratorio de Usos Múltiples y los análisis moleculares se realizaron en el laboratorio de Biología Molecular, ambos en el departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, Edo. De México.

Cuadro 2. Localización de los sitios de muestreo.

No.	Lugar de muestreo	Coordenadas
1	Las Jaras, Pénjamo, Gto.	20.376630 -101.919090, 1674 msnm
2	La Estrella, Pénjamo, Gto.	20.37656 -101.92329, 1675 msnm
3	La Estrella, Pénjamo, Gto.	20.37656 -101.92329, 1675 msnm
4	Colorado de Herrera, Pénjamo, Gto.	20.31386 -101.83695, 1685 msnm
5	La Estación, Pénjamo, Gto.	20.38724 -101.70074, 1704 msnm
6	Vista hermosa, Pénjamo, Gto.	20.38581 -101.69075, 1701 msnm
7	Maritas, Abasolo, Gto.	20.32413 -101.59092, 1716 msnm
8	Los Prietos, Salamanca, Gto.	20.60720 - 101.26907, 1713 msnm

3.2 Aislamiento de microorganismos (adaptado de French y Hebert, 1982)

Al material colectado, dependiendo de la parte de la planta, (raíz, espiga o tallo) se procedió a hacer un lavado superficial con agua corriente para quitar el exceso de tierra. Se realizaron cortes de aproximadamente 0.5 cm de tejido de raíz, espiga y tallo de cada muestra y se realizó un primer lavado con hipoclorito de sodio 25% durante unos segundos, hasta que estuviera bien mojado el tejido. Después se hizo otro lavado con alcohol etílico 70% durante unos segundos. Entre cada lavado se efectuaron enjuagues con agua destilada estéril. Los fragmentos de tejido se escurrieron sobre papel absorbente para eliminar el exceso de agua. Los trozos de tejido se sembraron en cajas Petri con medio de papa dextrosa agar (PDA) con ácido láctico. Las cajas Petri se incubaron a 27 °C. Una vez localizados los crecimientos fúngicos se transfirieron a nuevas cajas Petri con PDA y se incubaron a 27 °C para su crecimiento.

3.3 Purificación (adaptado de French y Hebert, 1982)

Se utilizó la técnica de cultivos monospóricos que consistió en extraer las esporas de cada cepa con 20 mL de agua destilada estéril, para obtener una suspensión de cada cepa. De la suspensión inicial, se tomó 1 mL y se vació en un tubo con 9 mL de agua destilada estéril para obtener una dilución de 1×10^{-1} . De la dilución 1×10^{-1} se tomó 1 mL y se vació en otro tubo con 9 mL de agua destilada estéril para obtener la dilución 1×10^{-2} . El procedimiento se repitió hasta

obtener la dilución 1×10^{-4} ó 1×10^{-5} dependiendo de la concentración de conidios de la suspensión inicial. De las diluciones 1×10^{-4} ó 1×10^{-5} se tomaron 100 μL y se colocaron en una caja con medio PDA, se dispersaron con una varilla de vidrio y se dejaron incubar a temperatura ambiente. Al tercer día se realizaron observaciones en el microscopio para detectar los primeros conidios germinados. De cada cepa se transfirió un conidio a una caja nueva con medio PDA y Se incubó a 27 °C.

3.4 Caracterización e Identificación morfológica

Consistió en sembrar un fragmento de 0.5 cm² de cada cepa en el centro de una caja Petri, en los medios PDA, Agar agua y medio CZAPEK, donde se observó la coloración. También se sembraron en el medio hoja de clavel, lo cual consistió en transferir un fragmento de 0.5 cm² del microorganismo deseado en el centro de una caja Petri con agar agua; y, alrededor del fragmento, a una distancia de 1.5 cm, se colocaron fragmentos de 2 cm de hojas de clavel previamente esterilizadas. Se incubaron a 27 °C hasta que el hongo creció sobre las hojas de clavel, en donde se observaron estructuras. Para la identificación de los aislados de utilizaron las claves taxonómicas de Barnett y Hunter (1972).

3.5 Técnicas moleculares

3.5.1 Extracción de DNA método CTAB 2% y acetato de sodio (adaptado de Doyle y Doyle, 1987; Weising *et. al.*, 2005)

El CTAB 2% se calentó a 60 °C, y se colocaron 1000 µL en tubos Eppendorf de 2 mL. Con una espátula estéril se extrajo micelio de la cepa purificada y se colocó dentro del tubo con CTAB. Se incubó a 80 °C durante 60 min, mezclado a intervalos de 10 min con aparato vortex. Al término de la incubación se centrifugó durante 5 min a 11,200 rpm. En un tubo Eppendorf nuevo se transfirió el sobrenadante. Se adicionaron 500 µL de cloroformo-isoamilico (24:1). Se mezcló durante 10 min por inversión a temperatura ambiente y se centrifugó por 10 min a 11,200 rpm. El sobrenadante se pasó a un tubo nuevo y se lavó con 700 µL de cloroformo-isoamilico (24:1). Nuevamente se mezcló durante 10 min por inversión a temperatura ambiente y se centrifugó por 10 min a 11,200 rpm. El sobrenadantes se llevó a otro tubo con 950 µL de etanol 100% previamente enfriado a -20 °C. Se mezcló suavemente por inversión durante 15 s. Se llevó a incubar por 2 h a -20 °C. Se centrifugó a 11,200 rpm por 30 min. Se decantó el sobrenadante evitando perder la pastilla. Se resuspendió la pastilla en 400 µL de TE y se incubó a 55 °C por 15 min. Se añadieron 34 µL de acetato de sodio 3 molar mas 1 mL de etanol 95%. Se incubó a -20 °C por 1 hora. Se centrifugó a 11,200 rpm por 5 min y se descartó el sobrenadante. La pastilla se lavó con 600 µL de isopropanol 70%. Se

centrifugó por 5 min y se dejó secar a temperatura ambiente. Se resuspendió la pastilla con 100 µL de TE y se almacenó a -20 °C.

3.5.2 Cuantificación y calidad del DNA

El DNA extraído se cuantificó utilizando un Nanodrop (espectrofotómetro) y el programa ND 1000® V3.5.2 (Accesolab S.A. de C. V., de acuerdo a las instrucciones del equipo).

3.5.3 Gel de agarosa

Para determinar la calidad del DNA se realizó una electroforesis en gel de agarosa 2% cargando 5 µL de la muestra de DNA Stock en cada pozo del gel, previamente mezclado con 4 µL de buffer de carga y en una cámara horizontal. Se utilizaron marcadores de 100 pb, y 1kb para estimar el peso molecular de las bandas producto. El tiempo de corrida generalmente fue de 45 a 60 min a 90 voltios. Para el revelado del gel de agarosa se sumergió en una solución de bromuro de etidio (0.5 µg/mL) durante 10 min, y después se enjuagó en agua destilada por 10 min. Se llevó al foto documentador modelo Universal Hood II, BIORAD®, con el programa QuantityOne®.

3.5.4 Amplificación región ITS con PCR

Para amplificar la región ribosomal del DNA de los hongos con la reacción PCR-ITS se utilizaron los siguientes iniciadores (primers) (Cuadro 3):

- ITS 5HP: 5'-GGA-AGG-AGA-AGT-CGT-AAC-AAG-G-3'
- ITS NL4: 5'-GGT-CCG-TGT-TTC-AAG-ACG-G-3'

Las condiciones de termociclaje fueron: desnaturalización inicial de 95 °C por 4 min, 35 ciclos (94 °C por 1 min; 58 °C por 1 min; 72 °C por 2 min) y un ciclo de extensión final de 72 °C por 10 min. Los productos de la PCR se visualizaron en geles de agarosa 2% acorde a la técnica antes mencionada. Las reacciones de PCR-ITS se realizaron con un volumen final de 50 µL. La taq polimerasa utilizada fue de la marca PROMEGA ® Se realizó un gel de agarosa para determinar la calidad del fragmento amplificado.

Cuadro 3. Reactivos utilizados para la reacción PCR-ITS.

Reactivo	Concentración	Volumen/tubo	Concentración final
HPLC	Ajustar a 50 µL	6.7 µL	-----
Buffer	5X	10 µL	1X
MgCl ₂	25 mM	5 µL	2.5 mM
dNTP's	500 mM	20 µL	200 mM
Iniciador 5HP	10 pM	1.5 µL	15pM
Iniciador NL4	10 pM	1.5 µL	15pM
Taq polimerasa	5 U/µL	0.3 µL	1.5 U
DNA	20 ng	5 µL	2ng

3.5.5 RFLPs

Para la técnica de PCR-RFLPs se utilizó el producto de PCR de la región ITS más las enzimas de restricción (Cuadro 4). La reacción de digestión se preparó de acuerdo a las especificaciones de cada fabricante y se incubaron a 37 °C por un periodo de aproximadamente 12 h. Para la visualización de los cortes producidos por las enzimas se utilizaron geles de acrilamida.

Cuadro 4. Enzimas de restricción utilizadas para la técnica PCR-RFLP.

Enzima	Secuencia de reconocimiento	Fabricante
Hinf I	G↓ANTC	Fermentas
Hha I	GCG↓C	Promega
Hae III	GG↓CC	Promega

3.5.6 ISSRs (Inter Sequence Simple Repeats)

Antes de iniciar la técnica de PCR-ISSR se realizó una prueba preliminar con diferentes primers para seleccionar aquellos que arrojaran mayor información. Los primers seleccionados fueron: (AC)₈YG y AC(GACA)₄. Se utilizó un termociclador automático (GeneAmp PCR System 9700 Applied Biosystems) con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial de 95 °C por 3 min, 35 ciclos (95 °C por 30 s.; 55 ó 46 °C por 45 s.; 72 °C por 2 min), y un ciclo de extensión final de 72 °C por 10 min. Las reacciones se realizaron con un volumen final de 25 µL.

Cuadro 5. Reactivos utilizados para la reacción de PCR-ISSR.

Reactivos	Concentración	Volumen/tubo	Concentración final
HPLC	Ajustar a 25 µL	0.2 µL	-----
Buffer	5X	5 µL	1X
MgCl ₂	25 mM	2.5 µL	2.5 mM
dNTP's	500 mM	10 µL	200 mM
Primer	10 pM	2 µL	20pM
Taq polimerasa	5 U	0.3 µL	1.5 U
DNA	20 ng	5 µL	4 ng

Para la visualización de los productos de PCR-ISSR se utilizó el protocolo del gel de acrilamida.

3.5.7 Gel de acrilamida

Para la separación de los fragmentos amplificados, se utilizó una cámara vertical. Los cristales de la cámara se limpiaron con etanol 70% y papel Kim Wipes®. La preparación del gel de poliacrilamida 6% se menciona en el Cuadro 6. Se vació la poliacrilamida en los cristales y se colocó un peine con 50 pozos y se dejó solidificar durante 40 min. Los cristales se colocaron en la cámara, se sujetaron con pinzas y se agregó el buffer de corrida TAE 1X. Se cargaron 5 µL de cada muestra (mezcladas previamente con 6 µL buffer de carga), también se colocaron marcadores peso de 100 pb y 1 kb como referencia. La cámara se conectó a una fuente de poder y se corrió a 200 voltios durante 2 h. Los geles se revelaron con las siguientes soluciones en agitación constante de acuerdo al siguiente orden: 1) solución fijadora de etanol 10% y ácido acético 1%, durante 10 min y se retiró. 2) solución de tinción con nitrato de plata 0.2% durante 10

min y se retiró. 3) enjuague con agua destilada. 4) solución reveladora de Hidróxido de sodio 3% con formaldehído (100 µL por cada 100 mL) hasta la visualización de las bandas.

Cuadro 6. Preparación para una placa de 60 mL (Valadez, *et. al.*, 2000).

Reactivos para gel de poliacrilamida 6 %	Volumen
Acrilamida-bisacrilamida 30%	13 mL
Agua destilada	35 mL
TBE 5X	12 mL
APS (Persulfato de amonio) 10%	420 µL
TEMED (NNNN Tetramethylethylenediamine 99%)	35 µL

3.5.8 Bioestadística: codificación de geles y dendogramas

A partir del revelado de los geles del acrilamida se observaron bandas de los productos de los RFLPs e ISSRs, las cuales se les calculó el peso de cada una con respecto a los marcadores de 100 pb y 1 kb. Se generó una matriz binaria (1= presencia de banda, 0= ausencia de banda) utilizando en programa Microsoft® Office Excel®. La matriz binaria se llevó al programa FreeTree© versión 0.9.1.50 para ser analizada utilizando el índice Jaccard y el método de construcción de árbol de agrupamiento par con media aritmética no ponderada (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) UPGMA. Para visualizar el dendograma se utilizó el programa TreeView© versión 1.6.6.

3.5.9. Proceso de secuenciación

Las cepas que se secuenciaron, fueron seleccionadas acorde a las características que arrojaron las pruebas en diferentes medios de cultivo, RFLPs e ISSRs.

3.5.9.1 Amplificación del gen de factor de elongación y traducción (TEF)

Para secuenciar las cepas de *Fusarium*, se amplificó el gen del factor de elongación y traducción (TEF, por sus siglas en ingles), para lo cual se requirió de dos iniciadores (Cuadro 7). Las condiciones de termociclaje fueron las siguientes: un ciclo de 30 s a 94 °C; 40 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 62 °C, 15 min a 72 °C; y extensión final de 2.5 min a 72 °C. Se preparó la mezcla de reacción acorde a la Cuadro 8 (20 µL de mezcla de reacción y 5 µL de DNA). Las amplificaciones se visualizaron en gel de agarosa 2 % durante 90 min a 90 voltios. Posteriormente se tiñó con bromuro de etidio.

Cuadro 7. Secuencias de los iniciadores que amplifican el gen TEF.

Iniciador	Secuencia de reconocimiento
EF-1	5'-ATGGGTAAGGAAGGACAAGAC-3'
EF-2	5'-GGAAGGTACCAGAGCGATCTCATG-3'

Cuadro 8. Reactivos utilizados en la mezcla de reacción.

Reactivo	Concentración	Volumen/tubo	Concentración final
HPLC	Ajustar a 25 μ L	0.7 μ L	-----
Buffer	5X	5 μ L	1X
MgCl ₂	25 mM	2.5 μ L	2.5 mM
dNTP's	500 mM	10 μ L	200 mM
Iniciador EF-1	10 pM	2 μ L	20pM
Iniciador EF-2	10 pM	2 μ L	20pM
Taq polimerasa	5 U/ μ L	0.3 μ L	1.5 U
DNA	40 ng	2.5 μ L	4 ng

3.5.9.2 Limpieza de las amplificaciones

Antes de secuenciar las muestras amplificadas con el gen TEF, se procedió a limpiarlas para eliminar los nucleótidos e iniciadores que quedaron del proceso de la PCR. Se utilizó la enzima EXO-SAP (Shrimp Alakaline Phosphatase y Exonuclease I) de Promega®. Se mezclaron 2 μ L de la enzima ExoSAP con 5 μ L del producto de PCR. La mezcla se incubó durante 1h a 37 °C y posteriormente 15 min a 72 °C. Al finalizar, se cuantificó la concentración de DNA y se realizaron los cálculos pertinentes para tener una concentración final de 20 ng/ μ L.

3.5.9.3 Secuenciación

Al finalizar la limpieza, se tomaron 10 µL de la mezcla de reacción para secuenciación (Cuadro 9), a la cual se le adicionaron 10 µL de agua MiliQ y 30 µL de etanol 95% (frio) y se dio vortex, dejando reposar por 30 min a temperatura ambiente y oscuridad. Al finalizar los 30 min se centrifugó la muestra por 20 min a 14 000 rpm. Se inclinó el tubo y se retiro la mezcla del alcohol, con ayuda de una micropipeta colocando la punta del lado contrario al pellet (cuidado de no perder la pastilla). Se lavó con 125 µL de etanol al 70% y se centrifugó por 10 min a 14,000 rpm; pasado el tiempo se retiró el etanol. Se dejó secar la pastilla en el termo-block (90 °C por 1minuto) para evaporar el exceso de etanol y se resuspendió la pastilla en 10 µL de formamida. Se tomó 1µL de la reacción y se colocó en el Secuenciador 3130X Applied Biosystems®.

Cuadro 9. Reactivos utilizados en la mezcla de reacción para secuenciación.

Reactivo	1X
Big Dye	1 µL
Buffer 5X	1.5 µL
DNA-PCR	1 µL
Primer	4 µL
Agua MiliQ	2.5 µL
Volumen total	10 µL

3.5.9.4 Análisis de secuencias

Una vez obtenidas las secuencias de las muestra de cada uno de los microorganismo, se editaron empleando los programas Finch TV 1.4.0.© y Bio Edit Sequence Aligment Editor© para alinear las secuencias obtenidas.

Se realizó una comparación con las secuencias reportadas en el GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) mediante el programa BLAST. Además, se tomaron secuencias reportadas por el GenBank y las obtenidas en este trabajo, con las cuales se generó un árbol filogenético utilizando el programa Mega 6.

3.6 Prueba de patogenicidad

En base a los agrupamientos obtenidos con los RFLPs (Figura 16) y características morfológicas, se seleccionó una cepa de cada agrupamiento y así, conformar los 15 primeros tratamientos evaluados. A partir del tratamiento 16 y hasta el tratamiento 27 se hicieron combinaciones entre representantes de los agrupamientos. El tratamiento 28 fue el testigo negativo (Cuadro 10). Se diseñó un experimento completamente al azar con 4 repeticiones por tratamiento y cada unidad experimental consistió en un vaso con 4 plantas de trigo. La semilla de trigo, proporcionada por INIFAP, CEBAJ fue la variedad Cortázar S94.

Cuadro 10. Tratamientos evaluados en la prueba de patogenicidad.

Tratamiento	Agrupamiento	Cepa utilizada
1	1	E 5.3
2	2	R 8.5
3	3	T 1.13
4	4	T 1.17
5	5	T 5.10
6	6	R 5.5
7	7	R 5.7
8	8	R 6.7
9	9	T 1.2
10	10	T 1.15
11	11	R 6.10
12	12	E 5.1
13	13	E 5.2
14	14	R 1.10
15	15	T 6.1
16	3, 4, 5, 6, 7, 8	T 1.13, T 1.17, T 5.10, R 5.5, R 5.7, R 6.7
17	10,11,12,13, 14,15	T 1.15, R 6.10, E 5.1, E 5.2, R 1.10, T 6.1
18	1, 2	E 5.3, R 8.5
19	1, 16	E 5.3, T 1.13, T 1.17, T 5.10, R 5.5, R 5.7, R 6.7
20	1, 9	E 5.3, T 1.2
21	1, 17	E 5.3, T 1.15, R 6.10, E 5.1, E 5.2, R 1.10, T 6.1
22	2, 16	R 8.5, T 1.13, T 1.17, T 5.10, R 5.5, R 5.7, R 6.7
23	2, 9	R 8.5, T 1.2
24	2, 17	R 8.5, T 1.15, R 6.10, E 5.1, E 5.2, R 1.10, T 6.1
25	9, 16	T 1.2, T 1.13, T 1.17, T 5.10, R 5.5, R 5.7, R 6.7
26	16, 17	T 1.13, T 1.17, T 5.10, R 5.5, R 5.7, R 6.7, T 1.15, R 6.10, E 5.1, E 5.2, R 1.10, T 6.1
27	9, 17	T 1.2, T 1.15, R 6.10, E 5.1, E 5.2, R 1.10, T 6.1
28	Testigo	Agua

3.6.1 Inoculación y siembra

Para la preparación del inoculo se incrementó cada hongo en medio PDA y se incubaron a 27 °C durante 10 días. Posteriormente, se extrajeron los conidios agregando agua destilada estéril y con una varilla de vidrio. Se obtuvo una suspensión de conidios de cada cepa a las cuales se les realizaron conteos con ayuda de una cámara de Neubauer, de acuerdo a la técnica de French y Herbert (1982), para estimar y obtener una concentración de 1×10^6 microconidios/mL (Pastor y Abawi, 1987; Velásquez *et al.*, 2002). Cada suspensión conidial representó un tratamiento, además se realizaron mezclas de suspensiones. La semilla se desinfestó sumergiéndola en una solución de hipoclorito de sodio 2% durante un minuto y después se lavó tres veces con agua estéril. Las semillas se sumergieron en cada tratamiento durante 10 min. Posteriormente se sembraron 4 semillas por vaso de unicel no.10 con sustrato vermiculita. Los vasos se mantuvieron en invernadero hasta su evaluación y se les dieron riegos de mantenimiento. Durante ese periodo se tomaron datos de temperatura máxima y mínima.

3.6.2 Evaluación del experimento

Las plantas se retiraron de los vasos a los 30 días, se lavaron las raíces con agua corriente y se secaron. Se midieron altura de planta y longitud de raíces. La severidad de la enfermedad se estimó utilizando una escala de daño

generada a partir de los síntomas que presentaron las plantas (Cuadro 11 y Figura 6).

Cuadro 11. Escala de daño para evaluar el daño por *Fusarium* en sistema radical.

Escala	Descripción	Porcentaje
1	Planta sana, síntomas no visibles en raíz y corona sin necrosis ni degradación de raíces.	0 %
2	Daño inicial en la raíz, cambio de coloración en una porción de esta, corona sana.	10 %
3	Avance del daño en raíces mostrando un color café (inicio de necrosis) y corona sana.	25 %
4	Degradación de raíces, necrosis e inicio daño en cuello.	50 %
5	Necrosis avanzada del sistema radicular y cuello.	75 %
6	Corona y raíz completamente necrosada.	100 %



Figura 6. Sintomatología de la escala de daño.

3.6.3 Análisis de datos

Las variables estudiadas fueron: Altura de planta, Longitud de raíz y porcentaje de Severidad. Los datos obtenidos se les realizaron un análisis de varianza bajo un diseño completo al azar. Utilizando el programa SAS (Statistical Analyses System, versión 8) y se les hizo comparaciones de medias (Tukey, $\alpha = 0.05$).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Aislamiento de microorganismos

Se obtuvieron 116 cepas, de los cuales 46 fueron aisladas de raíz, 52 de tallo y 18 de espiga (Cuadro 12).

Cuadro 12. Número de microorganismos obtenidos de la siembra de tejido de trigo.

Lugar de muestreo	Raíz	Tallo	Espiga
Las Jaras, Pénjamo, Gto.	9	16	2
La Estrella, Pénjamo, Gto.	2	3	0
La Estrella, Pénjamo, Gto.	4	4	0
Colorado de Herrera, Pénjamo, Gto.	3	1	1
La Estación, Pénjamo, Gto.	7	10	7
Vista hermosa de la Trinidad, Pénjamo, Gto.	13	12	1
Maritas, Abasolo, Gto.	3	3	2
Los Prietos, Salamanca, Gto.	5	3	5

4.2 Purificación

Con la técnica de cultivos monospóricos se lograron purificar de manera exitosa los 116 aislamientos, esto fue imprescindible para continuar con las caracterizaciones morfológica y molecular de los microorganismos.

4.3 Caracterización morfológica

En base a las claves taxonómicas se lograron identificar en las cepas aisladas, las estructuras típicas del género *Fusarium*, como son macroconidios, microconidios y clamidosporas (Figura 7).

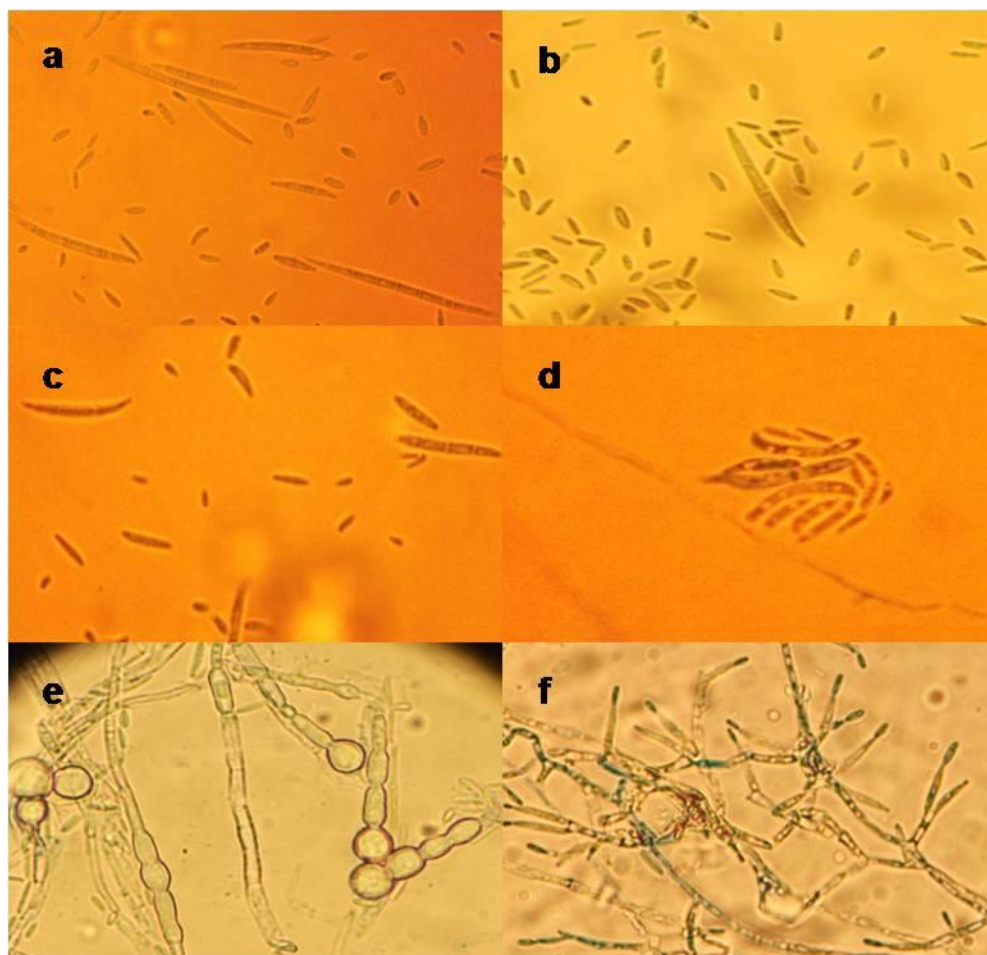


Figura 7. Estructuras de *Fusarium* sp., observadas al microscopio. a, b, c, d) macroconidios en forma de canoa y microconidios. e) clamidosporas. f) conidióforos.

En medio PDA, las coloraciones de las cepas tuvieron diferentes tonalidades de morado, rosa, naranja, y blanco (Figura 8).

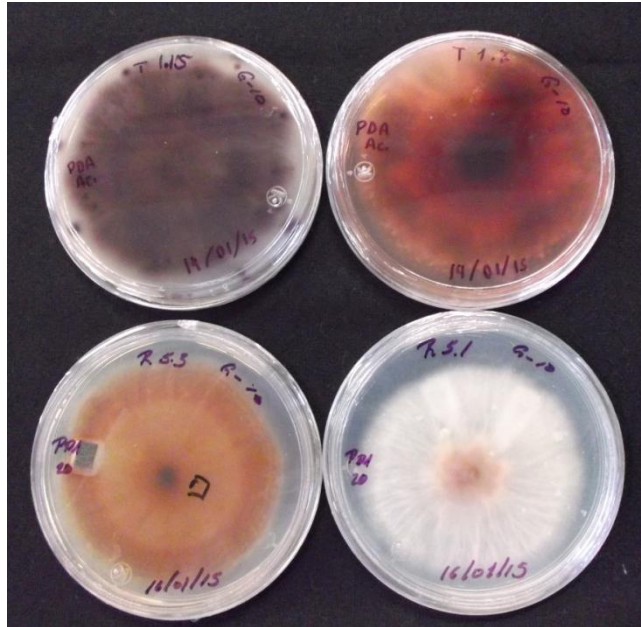


Figura 8. Diferentes coloraciones en algunas de las cepas de *Fusarium*.

4.4 Cuantificación y calidad de DNA

La cantidad de DNA que se extrajo de todas las muestras se mantuvo entre los rangos de 200 a 1000 ng/ μ L. Al analizar el DNA en el espectro de luz (260/280), se obtuvo un rango de 1.7 a 2.

4.5 Amplificación región ITS con PCR

Los fragmentos, obtenidos de la región ITS que fue previamente amplificada con los primers 5HP y NL4, fueron de aproximadamente 1,200 pares de bases, como se muestra en la Figura 9, en donde se aprecia la uniformidad del desplazamiento de las bandas, con lo que podemos suponer que los organismos son del mismo tipo.

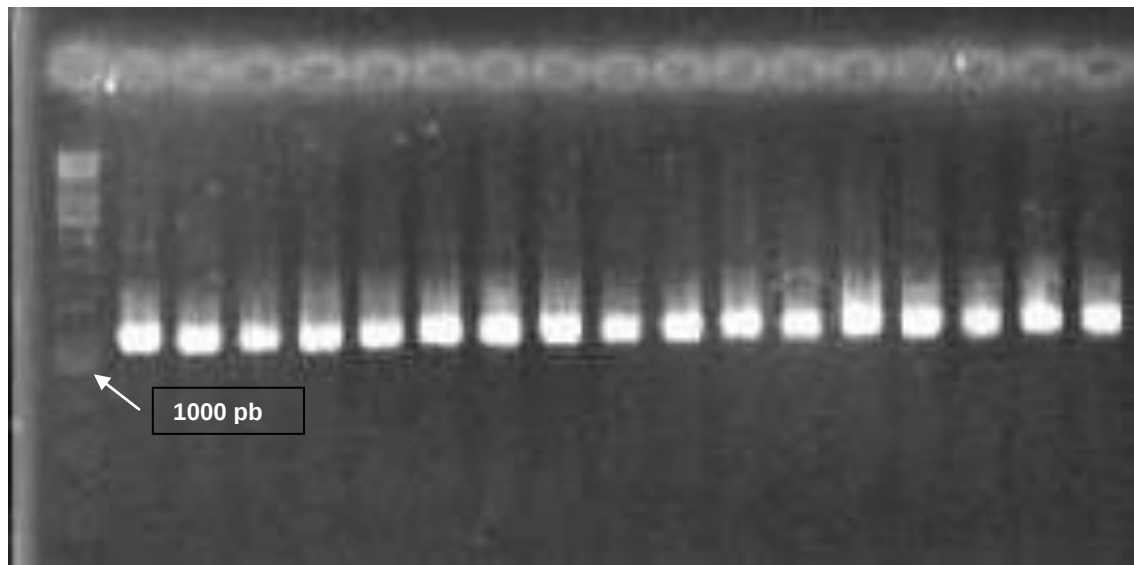


Figura 9. Gel de agarosa con los fragmentos amplificados de la región ITS. La flecha señala el marcador de 1000 pares de bases.

4.6 RFLPs

Los patrones producidos por las enzimas de restricción *Hha* I, *Hae* III y *Hinf* I obtenidos de la región ITS, mostraron algunos polimorfismos en los perfiles al haber sido cortados con dichas enzimas y ser separados en geles de poliacrilamida 6% (Figuras 10, 11 y 12). Por ejemplo, en las Figuras 10 y 11 se puede apreciar que las enzimas *Hha* I y *Hae* III produjeron tres tipos de polimorfismo, los cuales están resaltados con flechas. Mientras que en la Figura 12, se observa que la enzima *Hinf* I produjo dos tipos de polimorfismos, también se resaltan con flechas. Estas diferencias demostraron la presencia de diferentes especies de *Fusarium*.

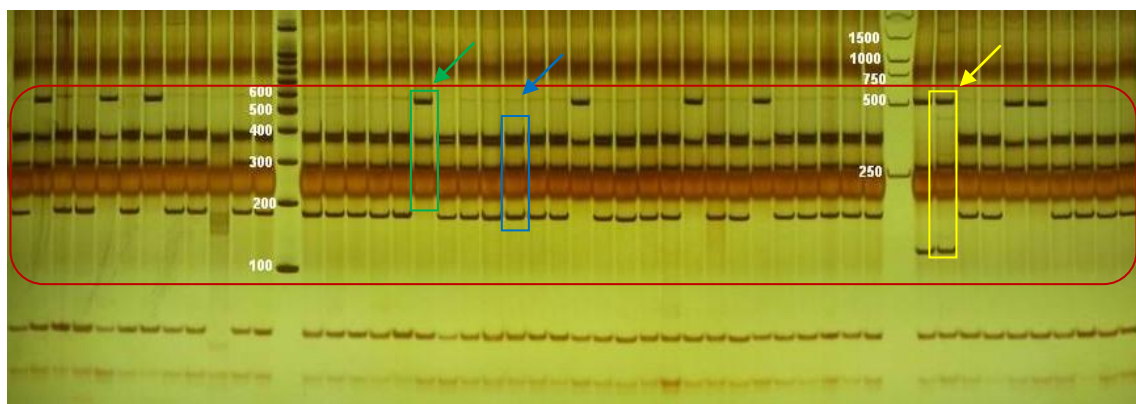


Figura 10. Perfiles obtenidos con la enzima *Hha* I, las bandas esperadas se ubican dentro del recuadro en rojo. Las flechas de color resaltan un tipo de polimorfismo.

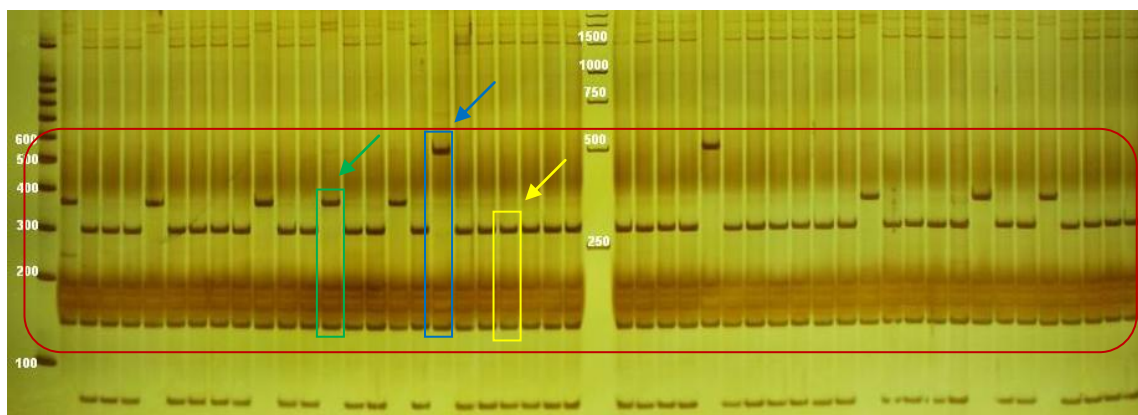


Figura 11. Perfiles obtenidos con la enzima *Hae* III, las bandas esperadas se ubican dentro del recuadro en rojo. Las flechas de color resaltan un tipo de polimorfismo.

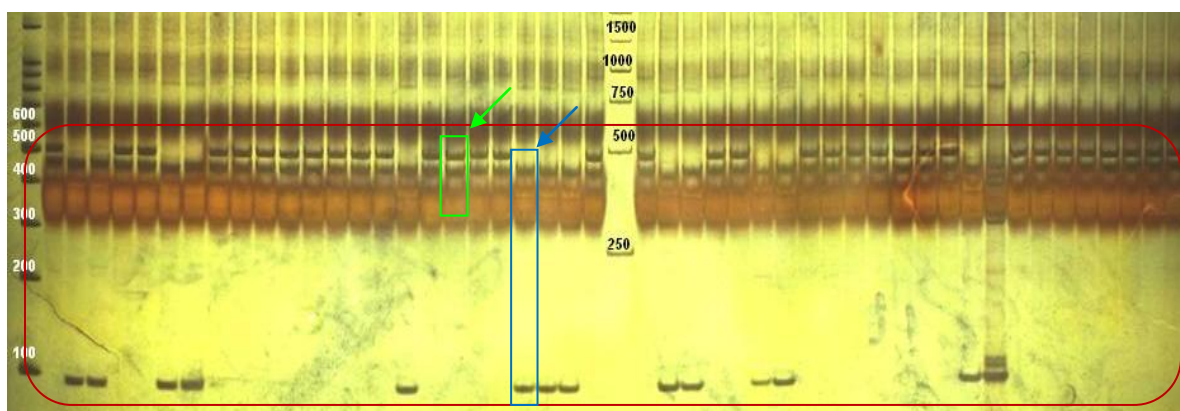


Figura 12. Perfiles obtenidos con la enzima *Hinf* I, las bandas esperadas se ubican dentro del recuadro en rojo. Las flechas de color resaltan un tipo de polimorfismo.

Derivado de lo anterior, los dendogramas generados a partir del análisis de los cortes con la enzima *Hha* I se formaron 6 agrupaciones (Figura 13). Mientras que las enzimas *Hae* III y *Hinf* I formaron 7 agrupaciones (Figuras 14 y 15). Cabe destacar que cada enzima agrupó de forma distinta a las cepas. Al hacer un cuarto dendograma integrando los datos de las tres enzimas, se originaron 15 agrupamientos (Figura 16). A pesar de utilizar RFLPs no se apreció claramente una separación que coincidiera con características morfológicas (tipo de micelio, color, etc.). No obstante, los 15 agrupamientos resultantes se emplearon para la prueba de patogenicidad en invernadero, seleccionando una cepa de cada agrupamiento.

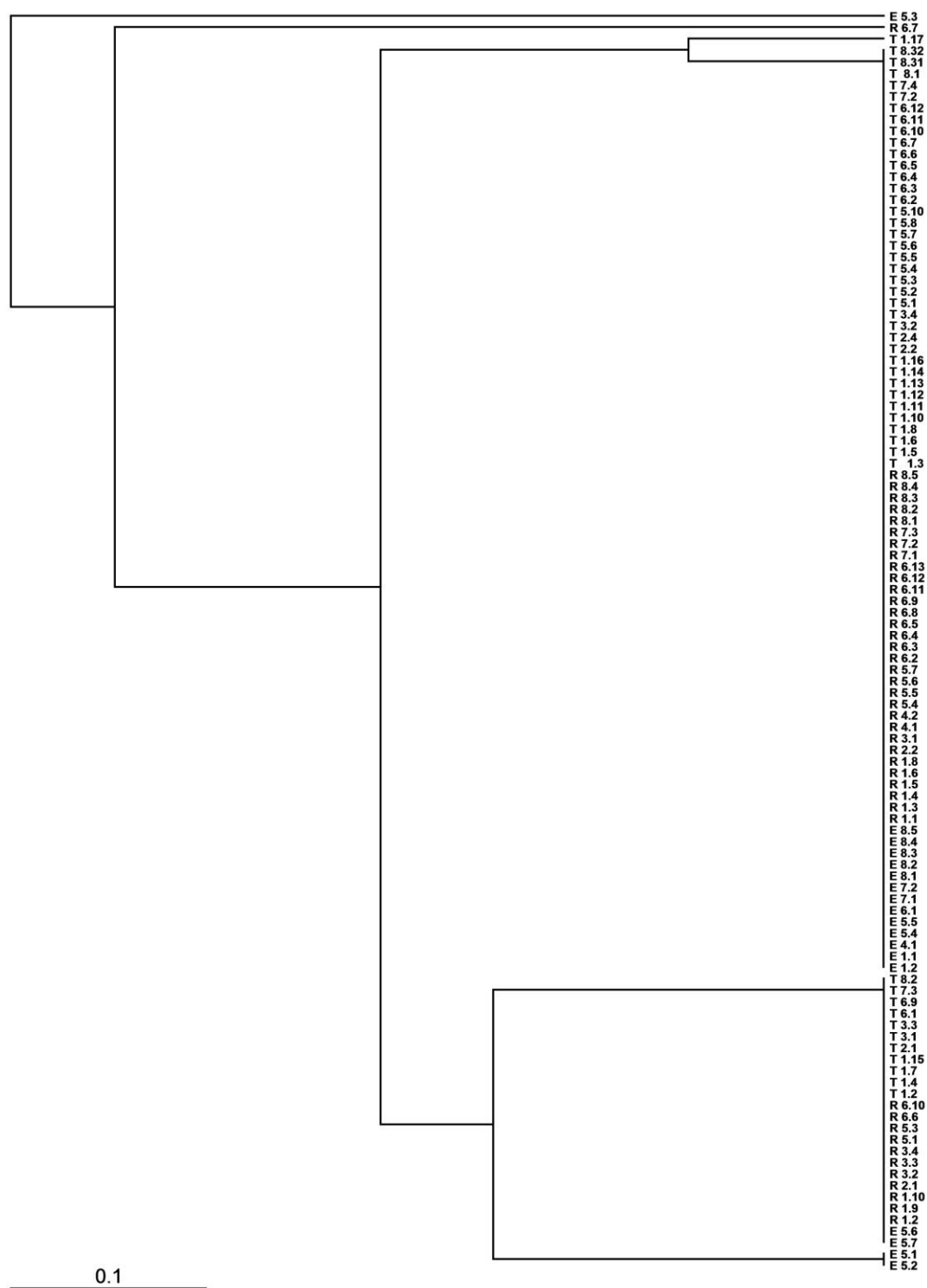


Figura 13. Dendrograma generado a partir de los cortes realizados con la enzima *Hha* I.

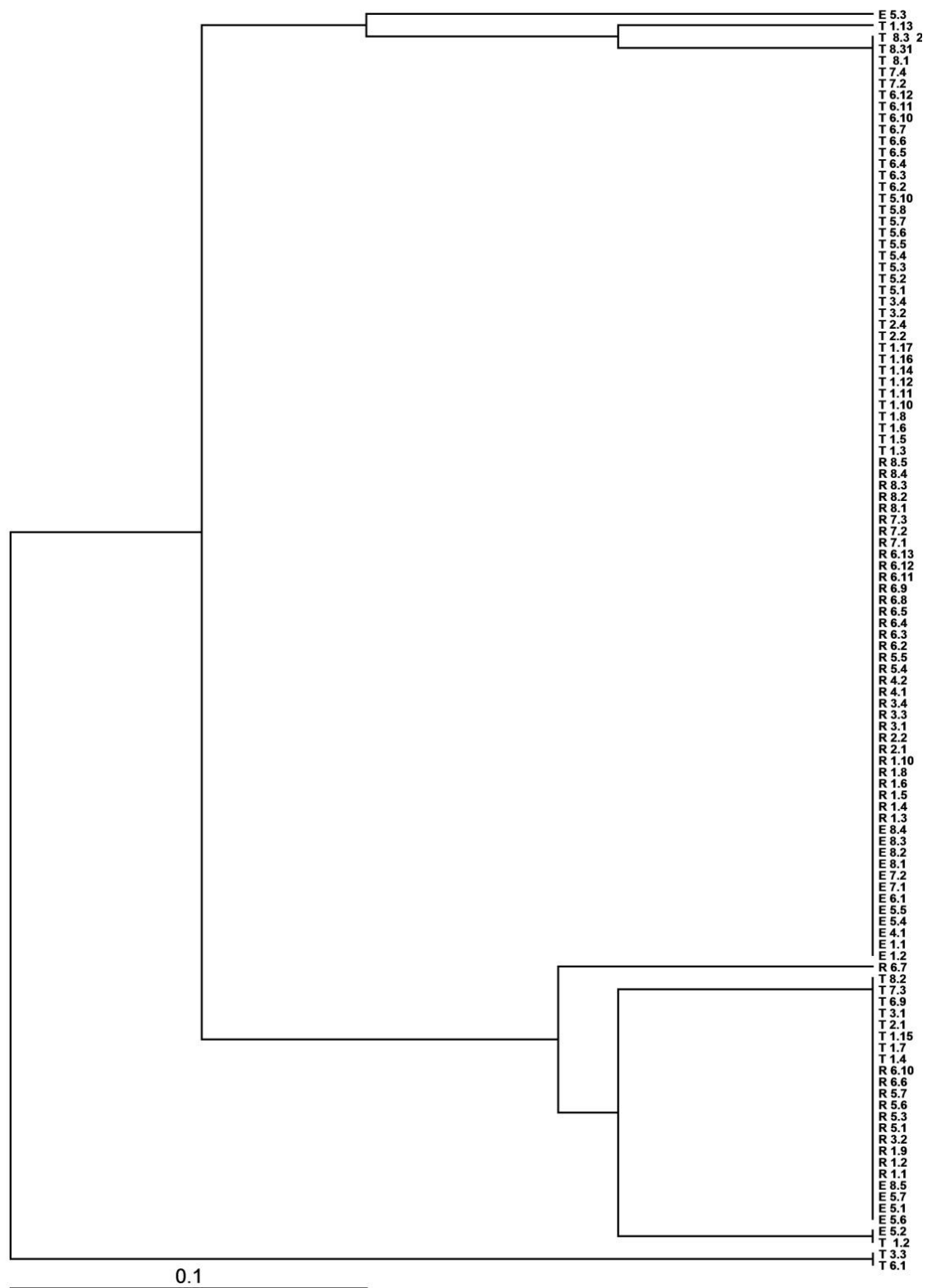


Figura 14. Dendrograma generado a partir de los cortes realizados con la enzima *Hae* III.

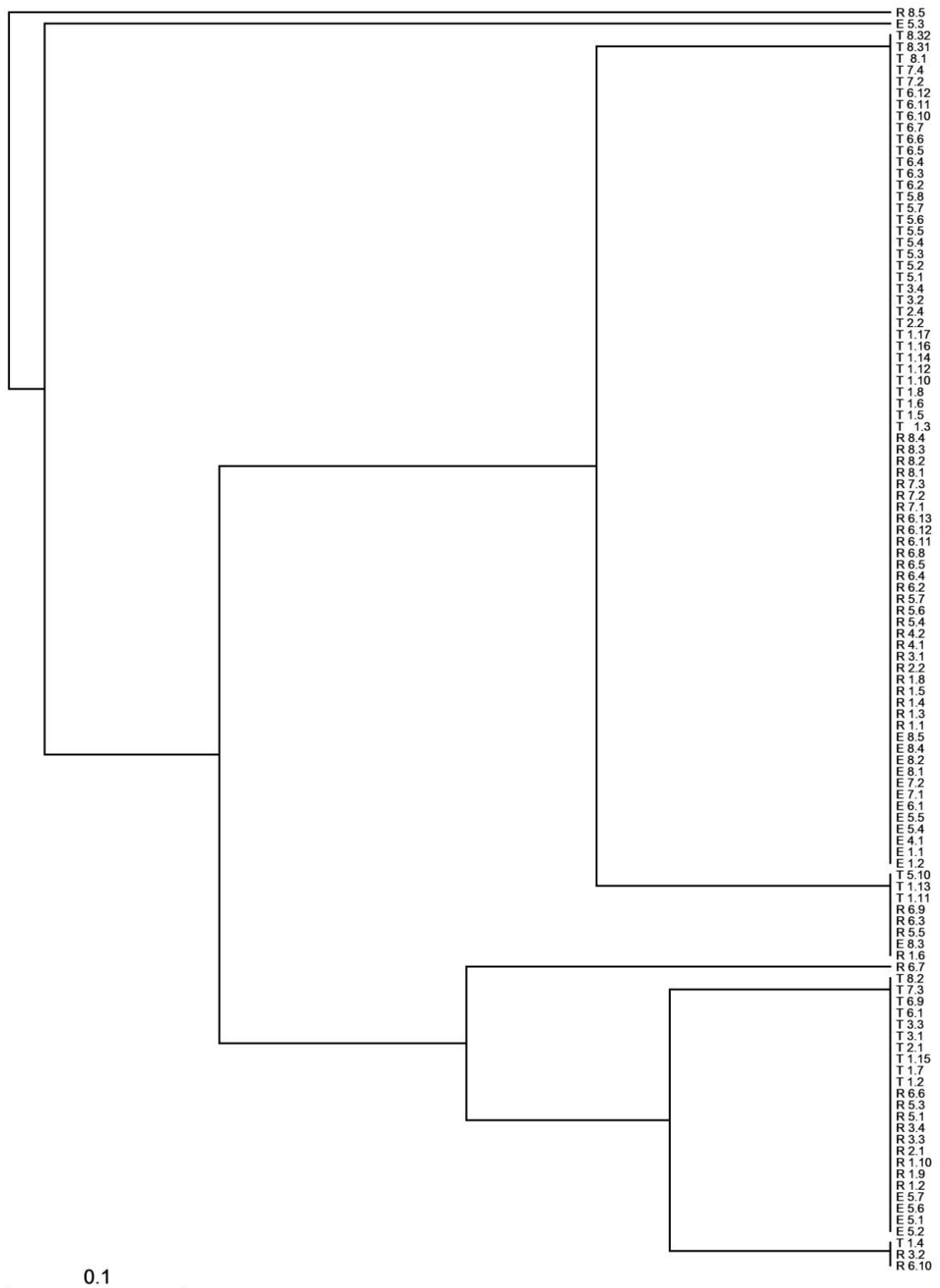


Figura 15. Dendrograma generado a partir de los cortes realizados con la enzima *Hinf* I.

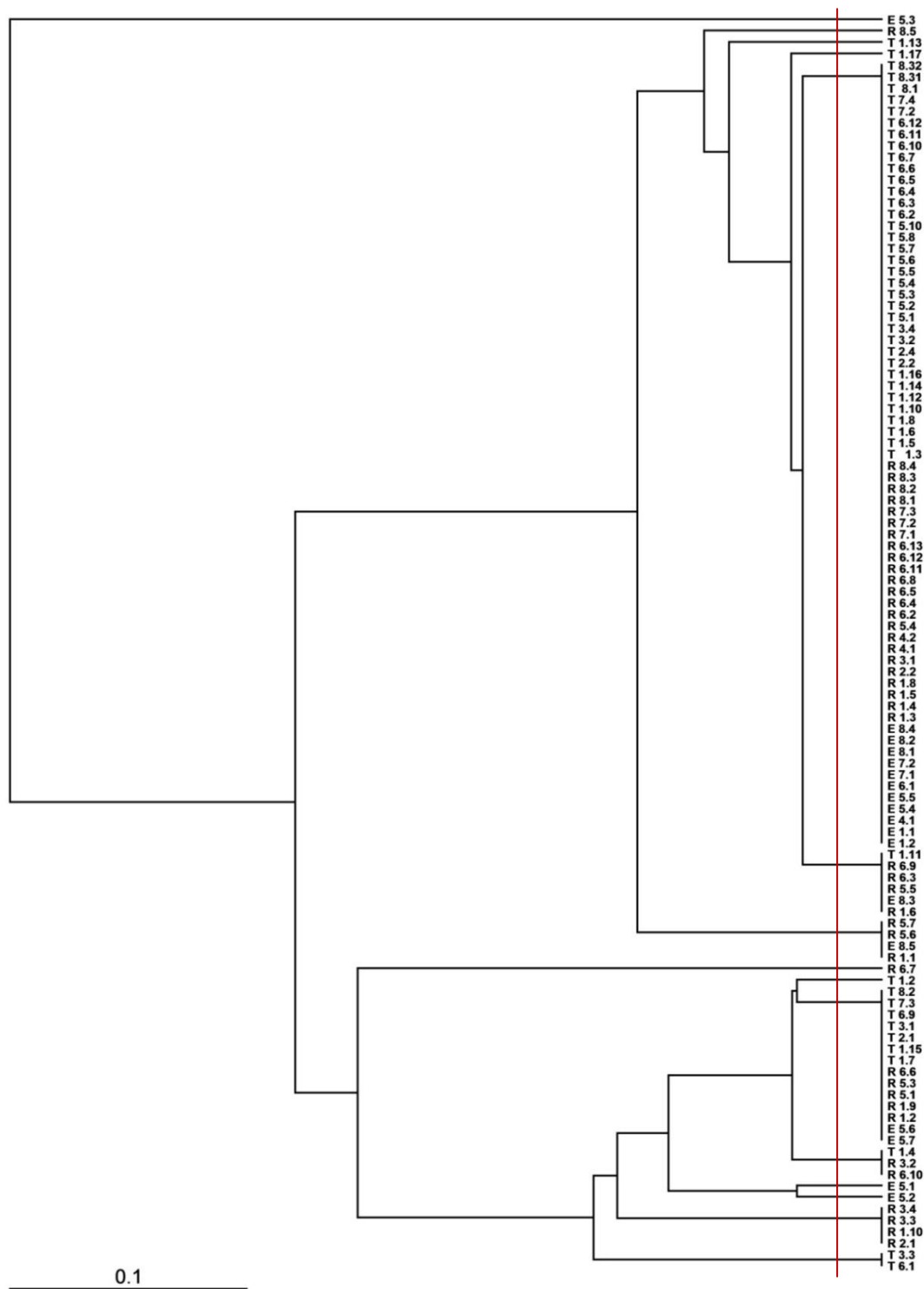


Figura 16. Dendrograma creado con la información de los cortes con las enzimas *Hha* I, *Hae* III y *Hinf* I, en el cual, se generaron 15 agrupamientos al haber realizado un corte con una perpendicular.

4.7 ISSRs

En las Figuras 17 y 18 se presentan los perfiles que produjeron los iniciadores (AC)8YG y AC(GACA)₄ al ser separados en geles de poliacrilamida 6%. Para el análisis del iniciador (AC)8YG se consideraron todas las bandas entre 400 y 2000 pb (Figura 17). Para el iniciador AC(GACA)₄ se consideraron las bandas entre 400 y 1500 pb (Figura 18). Las bandas generadas produjeron una diversidad de patrones, el registro de la ausencia o presencia de ellas detectó variantes (polimorfismos) dentro de individuos de una misma especie, estos polimorfismos los podemos traducir como mutaciones. En la Figura 17, las bandas dentro del recuadro azul indican una similitud entre las cepas de *Fusarium*, mientras que las bandas fuera del mismo recuadro indican diferencias entre las cepas. En la Figura 18, a pesar de que con el iniciador AC(GACA)₄ se visualizan mayor número de bandas esto significa mayor información con respecto al iniciador anterior; sin embargo, no se aprecia un patrón de bandas uniformes, lo que representa diferencias entre las cepas.

Al observar los dendogramas de los iniciadores (AC)8YG y AC(GACA)₄ (Figuras 19 y 20), se aprecia la complejidad de los polimorfismos ya que ya que los grupos están conformados por varias especies, esto puede ser a causa de una amplia diversidad genética debido a cambios en su estructura genética (mutaciones). En la Figura 21 se observa un dendograma hecho con la información de los dos iniciadores, donde se conformaron 14 agrupamientos; al contrastar estos con las características morfológicas como coloración y forma

de micelio, no se encontró ningún tipo de relación o similitud, lo que quiere decir que las cepas que comparten un mismo grupo varían en cuanto a forma de micelio, coloración y velocidad de crecimiento.

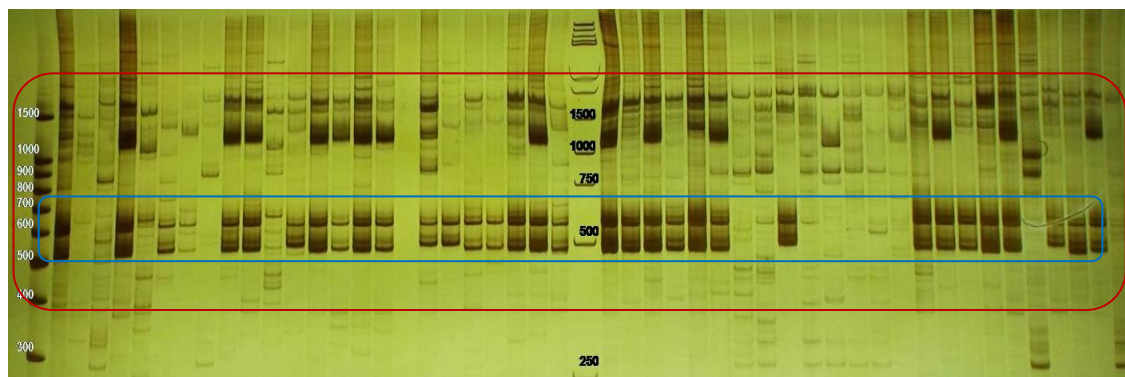


Figura 17. Perfiles obtenidos con el iniciador (AC)8YG, dentro del recuadro rojo se encuentran las bandas tomadas en cuenta para el análisis. En el recuadro azul se aprecia un perfil de bandas semejante.

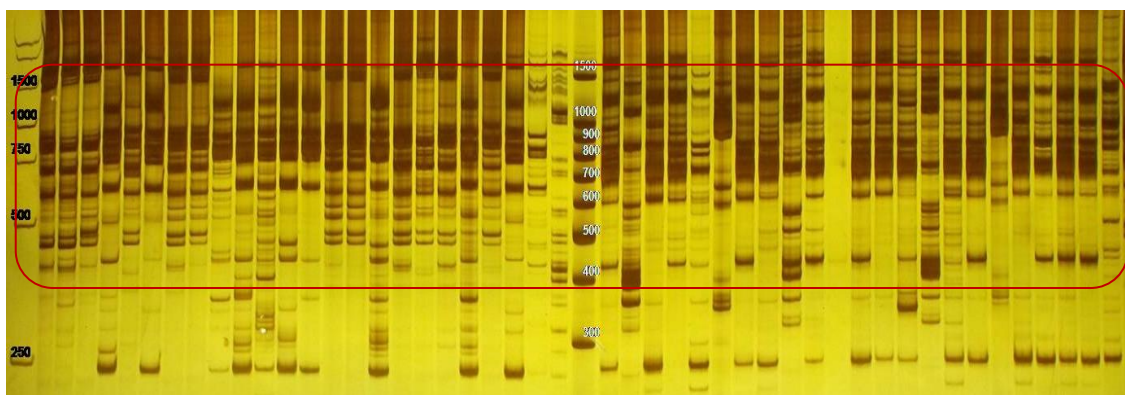


Figura 18. Perfiles obtenidos con el iniciador AC(GACA)₄, en el recuadro rojo se encuentran las bandas tomadas en cuenta para el análisis.

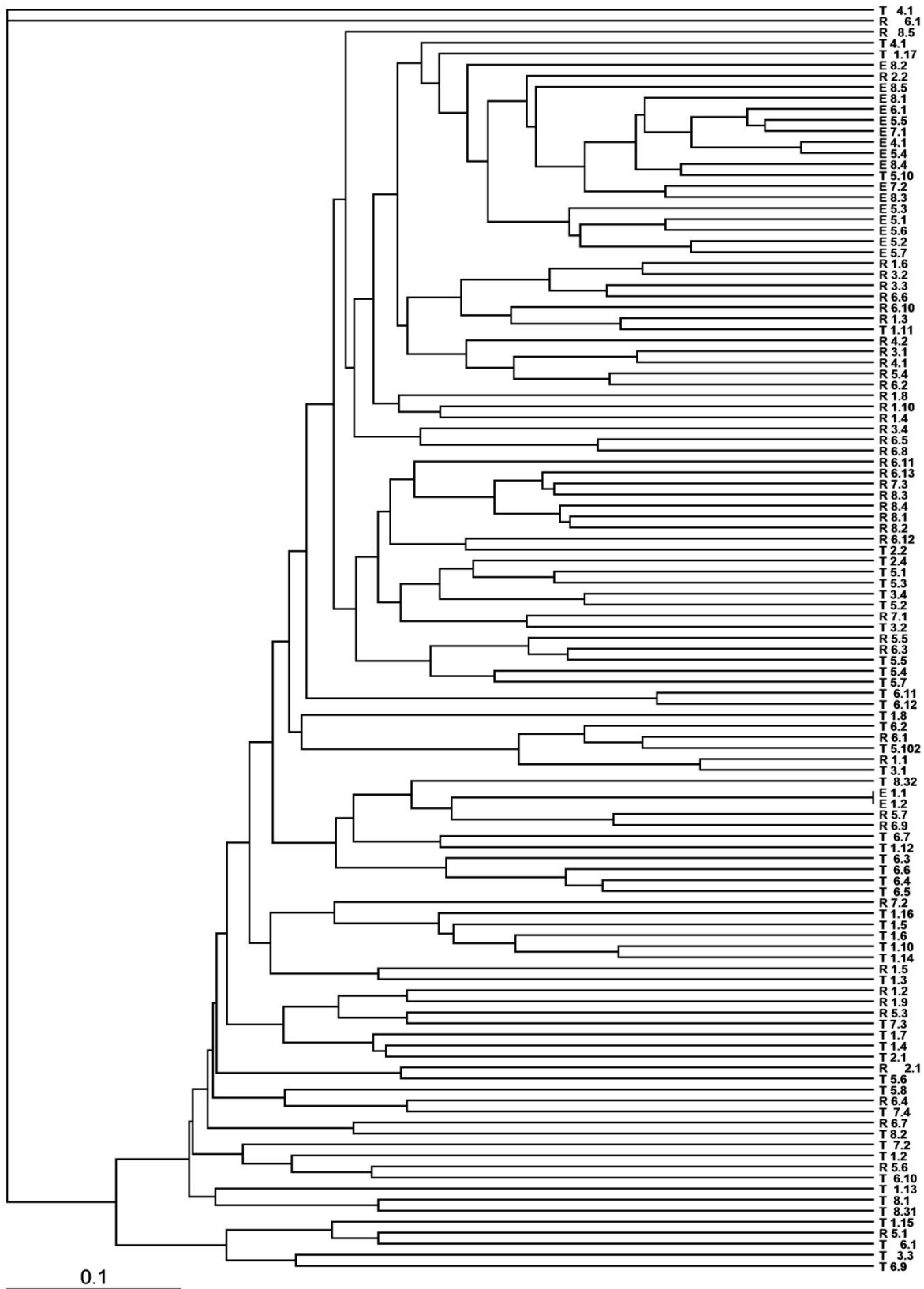


Figura 19. Dendrograma generado con el primer (AC)8YG.

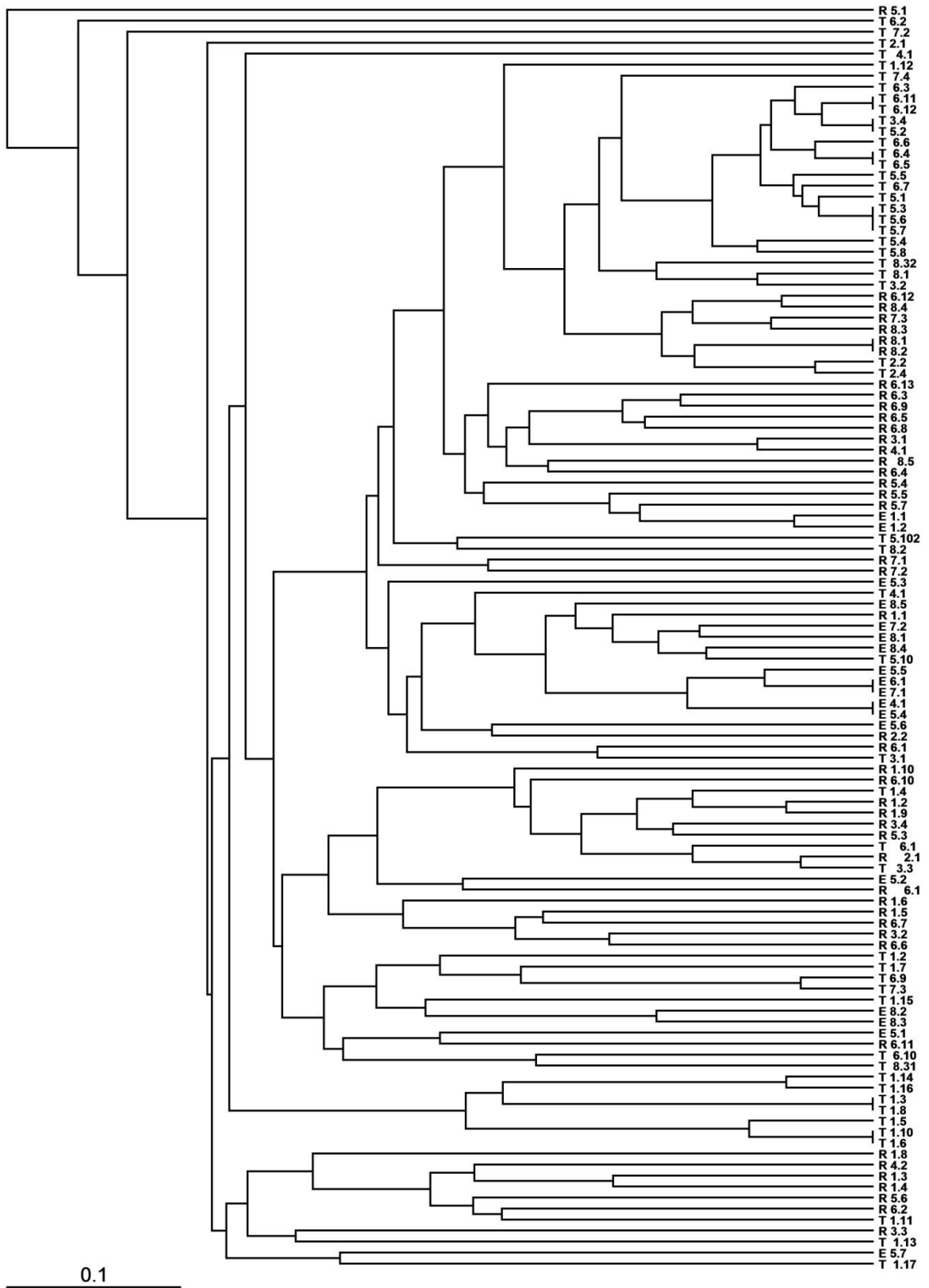


Figura 20. Dendrograma generado con el primer AC(GACA)₄.

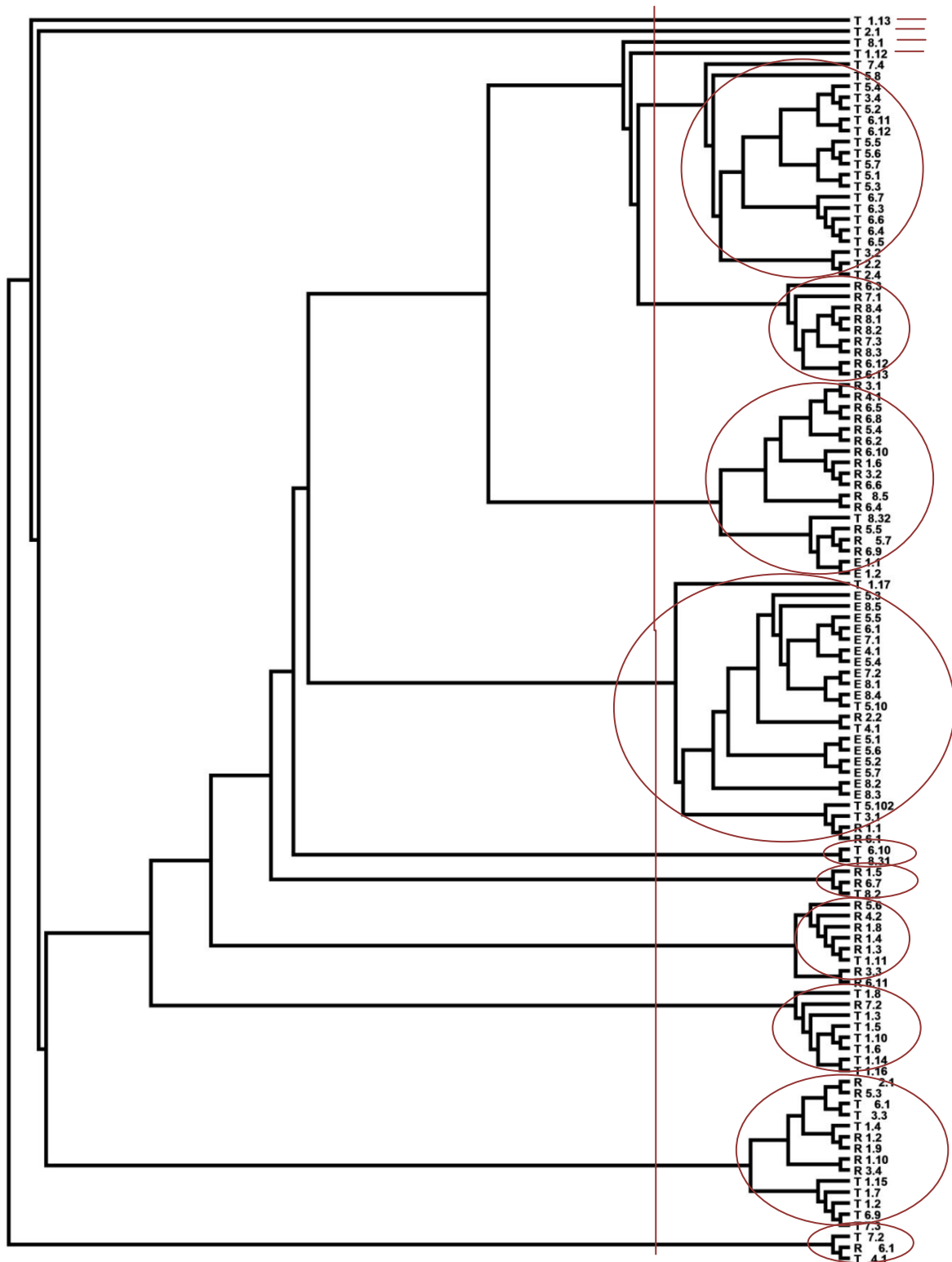


Figura 21. Dendrograma generado a partir de los primers (AC)₈YG y AC(GACA)₄, al realizar un corte transversal se distinguen 14 grupos.

4.8 Prueba de patogenicidad

4.8.1 Evaluación de altura de planta

De acuerdo al análisis de varianza ($\alpha = 0.05$) (Cuadro 17 del Apéndice) la prueba de comparación de medias (Tukey), no detectó diferencia significativa entre tratamientos, lo que significa que no existe variación sobre la altura de planta, por lo tanto la presencia de *Fusarium* no afecta claramente a esta variable, al menos hasta los 30 días de la planta (Cuadro 13).

4.8.2 Evaluación de longitud de raíz

El análisis de varianza ($\alpha = 0.05$) (Cuadro 18 del Apéndice) y la prueba de comparación de medias (Tukey), mostraron que existe diferencia significativa entre tratamientos, lo que significa que la longitud de raíz varió dependiendo del tratamiento, por lo tanto *Fusarium* puede afectar al sistema radical (Cuadro 14).

Cuadro 13. Comparación de medias con Tukey ($\alpha= 0.05$) de la altura de planta.

Tratamiento	Media	Agrupamiento*
T4	20.25	A
T3	20.125	A
T6	20	A
T8	19.8	A
T7	19.75	A
T9	19.675	A
T16	19.375	A
T2	19.375	A
T5	19.25	A
T10	19.125	A
T11	19	A
T1	18.875	A
T17	18.875	A
T15	18.875	A
T23	18.875	A
T26	18.75	A
T14	18.75	A
T24	18.625	A
T18	18.625	A
T21	18.625	A
T13	18.375	A
T22	18.375	A
T27	18.375	A
T12	18.325	A
T20	18.25	A
T25	17.875	A
T28	17.85	A
T19	17.625	A

*Tratamientos con la misma letra son estadísticamente iguales.

Cuadro 14. Comparación de medias con Tukey ($\alpha=0.05$) de la longitud de raíz.

Tratamiento	Media	Agrupamiento*		
T28	11.625	A		
T2	11.125	A	B	
T3	10.875	A	B	C
T4	10.625	A	B	C
T10	10.5	A	B	C
T21	10.5	A	B	C
T1	10	A	B	C
T26	10	A	B	C
T22	10	A	B	C
T13	9.875	A	B	C
T14	9.75	A	B	C
T23	9.625	A	B	C
T24	9.5	A	B	C
T20	9.375	A	B	C
T25	9.25	A	B	C
T19	9.25	A	B	C
T27	9.125	A	B	C
T5	9	A	B	C
T15	9	A	B	C
T6	9	A	B	C
T9	8.75	A	B	C
T18	8.75	A	B	C
T17	8.75	A	B	C
T16	8.625		B	C
T12	8.325		B	C
T8	8.25		B	C
T7	8.25		B	C

*Tratamientos con la misma letra son estadísticamente iguales.

4.8.3 Evaluación de severidad de la enfermedad

El análisis de varianza ($\alpha = 0.05$) (cuadro 19 del Apéndice) y la prueba de comparación de medias (Tukey), mostraron que existe diferencia significativa entre tratamientos, lo que indicó variabilidad en el grado de severidad de la enfermedad en los tratamientos, por lo tanto *Fusarium* puede afectar al sistema radical, causando diferentes porcentajes de severidad en el cultivo de trigo.

Por lo tanto, se rechaza la H_0 y se acepta la H_a , la cual indica que al menos uno de los aislados de *Fusarium* e incluso su combinación induce síntomas en trigo.

Los tratamientos 5 y 18 fueron los que produjeron mayor daño a las raíces de trigo, el que produjo menor daño fue el tratamiento 4, el tratamiento 28 fue el testigo. El tratamiento 5 estuvo conformado por la cepa T 5.10, el tratamiento 18 lo conformaron las variantes E 5.3 y R 8.5, aunque estos organismos por si solos no representaron un daño considerable (tratamientos 1 y 2 respectivamente).

Dentro del agrupamiento B se encontraron tratamientos que fueron conformados por varias cepas, las cuales fueron 22, 24, 27 y 23; también se encontraron tratamientos compuestos por un solo aislamiento, los cuales fueron 6, 7,8 y 9. Cabe destacar que en los tratamientos 23 y 27 se encontró también la cepa del tratamiento 9 (Cuadro 15) (cuadro 3 del Apéndice).

Cuadro 15. Comparación de medias con Tukey ($\alpha=0.05$) de la severidad de la enfermedad.

Tratamiento	% de severidad (media)	Agrupamiento*	
T5	39.75	A	
T18	27	A	B
T22	22.5		B
T9	18		B
T7	16.5		B
T6	16.25		B
T24	15.75		B
T27	15.25		B
T23	14.75		B
T8	13.5	B	C
T13	12		C
T15	11.25		C
T12	11		C
T25	9.5		C
T2	9.5		C
T16	9		C
T19	8.75		C
T26	8		C
T14	7.75		C
T21	7.5		C
T3	7.5		C
T11	6.5		C
T1	5.75		C
T10	5.5		C
T17	5.25		C
T20	4		C
T4	2.25		C
T28	0		C

*Tratamientos con la misma letra son estadísticamente iguales.

4.9 Resultados de secuenciación

Para secuenciar, se tomaron organismos representantes de acuerdo a los perfiles obtenidos de los RFLPs (Figura 16) e ISSRs (Figura 21); también se tomaron en cuenta aquellos organismos utilizados en la prueba de patogenicidad (Cuadro 10).

En el cuadro 16 se puede apreciar que el organismo con mayor presencia fue *Fusarium proliferatum*, seguido de *Fusarium subglutinans* y *Fusarium oxysporum*.

El organismo que causó mayor daño en raíces fue el T5.10, correspondiente a *F. proliferatum*, el cual causó un 39.75% de severidad a los 30 días después de la siembra del cultivo.

En el tratamiento 18, el organismo R8.5 también correspondió a *F. proliferatum*, el cual causó un 27% de severidad.

En la Figura 22 se muestra el árbol filogenético, el cual fue construido a partir de las cepas secuenciadas utilizando el gen TEF, donde se puede observar la agrupación por especies y utilizando secuencias del GenBank como referencia. Dentro del recuadro se aprecian diferentes especies de *Fusarium* (*F. subglutinans*, *F. proliferatum* y *F. thapsinum*).

Cuadro 16. Identidad de los organismos secuenciados.

Muestra	Organismo identificado	% de identidad
T8.1	<i>Fusarium proliferatum</i>	100
T1.2	<i>Fusarium proliferatum</i>	100
T5.2	<i>Fusarium proliferatum</i>	100
T5.7	<i>Fusarium proliferatum</i>	100
T6.3	<i>Fusarium proliferatum</i>	100
T3.2	<i>Fusarium proliferatum</i>	100
R8.4	<i>Fusarium proliferatum</i>	100
R7.3	<i>Fusarium proliferatum</i>	100
R6.5	<i>Fusarium proliferatum</i>	100
R6.10	<i>Fusarium proliferatum</i>	100
R8.5	<i>Fusarium proliferatum</i>	100
R5.5	<i>Fusarium proliferatum</i>	100
R5.7	<i>Fusarium proliferatum</i>	100
T5.10	<i>Fusarium proliferatum</i>	100
T6.1	<i>Fusarium subglutinans</i>	99
T3.3	<i>Fusarium subglutinans</i>	99
R1.10	<i>Fusarium subglutinans</i>	99
T1.15	<i>Fusarium subglutinans</i>	99
R 6.10	<i>Fusarium subglutinans</i>	99
T1.17	<i>Fusarium oxysporum</i>	99
R6.7	<i>Fusarium oxysporum</i>	99
R4.2	<i>Fusarium oxysporum</i>	99
T1.10	<i>Fusarium oxysporum</i>	99
T7.2	<i>Fusarium oxysporum</i>	99
T 1.8	<i>Fusarium oxysporum</i>	99
T 6.10	<i>Fusarium thapsinum</i>	99
T 1.13	<i>Fusarium thapsinum</i>	100
T 6.1	<i>Fusarium thapsinum</i>	99
T 2.1	<i>Fusarium andiyazi</i>	99
E 5.2	<i>Fusarium incarnatum</i>	99
E 5.1	<i>Fusarium equiseti</i>	98

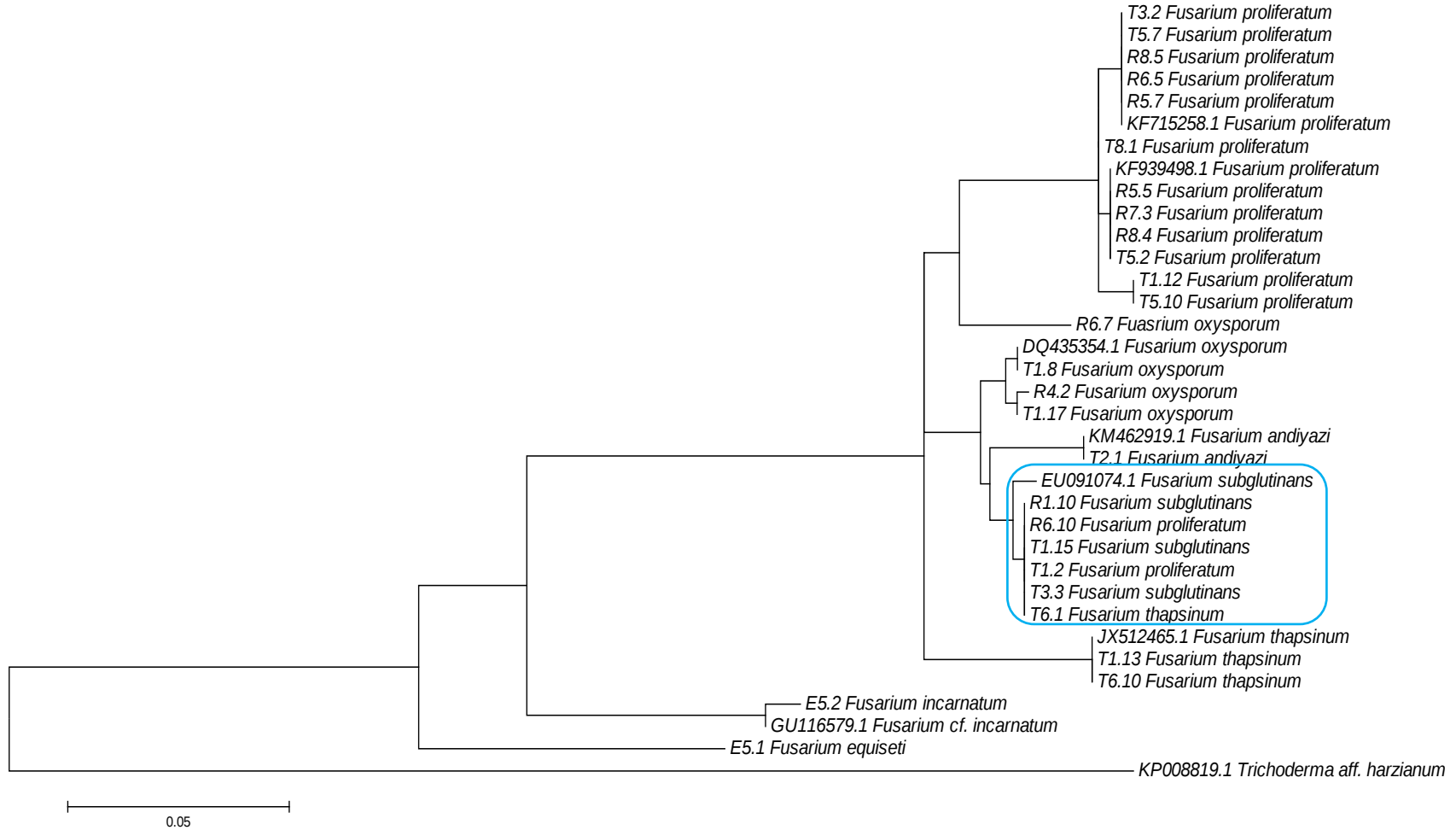


Figura 22. Árbol filogenético generado a partir de las cepas secuenciadas de *Fusarium* sp.

4.10 Discusión general

Dentro de las especies de *Fusarium* que se identificaron se encontraron *F. subglutinans*, *F. proliferatum*, *F. oxysporum*, las cuales coinciden con lo reportado por Delgadillo (2008); pero además se identificaron las especies *F. thapsinum*, *F. andiyazi*, *F. incarnatum* y *F. equiseti*. Leslie y Summerell (2006), reportaron que *F. thapsinum* y *F. andiyazi*, han sido comúnmente identificadas como *F. verticillioides* en los cultivos de sorgo y mijo. *F. incarnatum* y *F. equiseti* han sido reportados por Castellá y Cabañes (2014) como un complejo que ataca al cultivo de trigo en España. Además, de acuerdo a lo reportado por Burgess *et. al.* (2001), *F. equiseti* puede estar presente en tejido senescente y es considerado como saprofito, el cual actúa como un colonizador agresivo secundario.

La taxonomía de género *Fusarium* se ha caracterizado por ser controversial, como ejemplo es que hasta la fecha, se han publicado cerca de 10 propuestas diferentes de clasificación (Leslie y Summerell, 2006). Hasta hace unos años solo se basaba en características morfológicas, haciéndola complicada al utilizar métodos laboriosos y aún así, ineficiente para diferenciar a hongos estrechamente relacionados (Guarro *et al.*, 1999). Es por ello que la biología molecular es una herramienta útil que complementa la identificación y clasificación de seres vivos de un modo eficiente.

De acuerdo a lo reportado por O'Donnell *et al.* (2008), las secuencias del factor de elongación (TEF) son las más apropiadas para la taxonomía, filogenia e identificación de especies de *Fusarium*.

El análisis filogenético ha propiciado la identificación de especies filogenéticas dentro de especies morfológicas (el grupo más reducido de individuos reconocibles que comparten un linaje monofilético), de manera que éstas constituyen verdaderos complejos de especies. Ejemplos de complejos de especies son *F. oxysporum*, *F. solani*, *Gibberella fujikuroi*, *G. zeae*, entre otras (O'Donnell, 2000; O'Donnell *et al.*, 1998; 2004). Así, en el complejo de especies *G. fujikuroi* se han identificado 43 especies, ocho de las cuales corresponden con las especies biológicas caracterizadas por Leslie y Summerell (2006), y en la morfo-especie *F. graminearum* (teleomorfo *Gibberella zeae*) asociada a la Necrosis de la espiga de cebada y trigo se han diferenciado nueve especies, de las cuales la denominación *F. graminearum* se ha mantenido para la especie más comúnmente asociada con la enfermedad (O'Donnell *et al.*, 2004).

V. CONCLUSIONES

Las cepas de *Fusarium* no tuvieron el mismo efecto de patogenicidad al ser evaluadas de forma individual que en conjunto.

La mayor patogenicidad se identificó en la cepa T5.10 (*F. proliferatum*) y el efecto conjunto de R8.5 (*F. proliferatum*) y E5.3 (no identificado), causando más daño en las raíces a los 30 días después de la siembra.

Las distancias genéticas producidas en los RFLPs, conformaron agrupamientos, los cuales, sirvieron para seleccionar las cepas de *Fusarium* que se utilizaron en la prueba de patogenicidad.

Las agrupaciones generadas por los RFLPs e ISSRs al contrastarlos con características morfológicas, no produjeron algún tipo de similitud.

Las especies que se identificaron con la secuenciación fueron *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. oxysporum*, *F. thapsinum*, *F. andiyazi*, *F. incarnatum* y *F. equiseti*.

LITERATURA CITADA

- APS (The American Phytopathological Society).2015. Pagina web:
[http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/ascomycetes/Pages/
FusariumPort.aspx](http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/ascomycetes/Pages/FusariumPort.aspx). Última consulta: marzo, 2015.
- Backhouse D., Burgess L. W., and Summerell B. A. 2001. Biogeography of
Fusarium.In: *Fusarium*. Paul E. Nelson Memorial Symposium. APS
PRESS. St Paul, Minnesota.USA. 392 p.
- Barnett, H. L. and Hunter, B. B. 1972. Illustrated General of ImperfectFungi. 3er
ed. Burgess Publishing Company. Minneapolis. Minnesota. U.S.A. 241 p.
- Booth, C. 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Agricultural Bureaux
(CAB). Commonwealth Mycological Institute Kew, Surrey England. 237p.
- Burgess L. W., Backhouse D.,Summerell B. A. and Swan L.J. 2001. Crown rot
of wheatIn: *Fusarium*. Paul E. Nelson Memorial Symposium. APS PRESS.
St Paul, Minnesota.USA. 392 p.
- Castellá G., Cabañes F.J.2014.Phylogenetic diversity of *Fusariumincarnatum-
equiseti* species complex isolated from Spanish wheat. Antonie Van
Leeuwenhoek.106:309-317.
- CESAVEG, 2009. Comité Estatal de Sanidad Vegetal del Estado de
Guanajuato, A. C. pagina web: <http://www.cesaveg.org.mx>.
- (CESAVEG). 2010. Manual de Plagas y Enfermedades del Trigo. Manual
Técnico. CESAVEG. Irapuato, Guanajuato. 18 p.

- Delgadillo, S. F. 2008. Informe final de actividades del proyecto “Estudio para la identificación de los agentes causales de la pudrición de raíz y secado prematuro de cebada”. Fundación Guanajuato Produce A. C. Obtenido de la red. www.fundacionguanajuato.com. Última consulta: 30 de enero de 2012.
- Doyle, J. J. and Doyle, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19:11-15.
- Eguiarte, L. E., Souza, V. y Aguirre, X. 2007. Ecología molecular. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología. Universidad Nacional Autónoma de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, D.F. 608 p.
- FAOSTAT, 2015. <http://faostat.fao.org>. Última consulta: marzo, 2015.
- Fernandez M. L.; and Conner R. L. 2011. Root and crown rot of wheat. *Prairie Soils and Crops Journal* 4:155-157.
- Figueroa, R. G. 2010, “Caracterización de Especies de *Fusarium* asociadas a la pudrición de raíz de Maíz en Guanajuato México”. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 28:124-134.
- Flores O, A., Martínez S, J. P. y Martínez E, A. D. 1997. Nueva tecnología en la detección y el análisis genético de fitopatógenos. *In*: Tópicos selectos de Fitopatología: Genética Molecular. Sociedad Mexicana de Fitopatología (SMF). Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV Unidad Irapuato) 24-43 pp.

- French, E. R. y Herbert, T. T. 1982. Métodos de Investigación Fitopatología. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). San José, Costa Rica. 289 p.
- Gilchrist S. L., Fuentes D G., Martínez C. C., López A. R. M., Duveiller E., Singh R.P., Henry M., García A. I. 2005. Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada. Segunda edición. México, D.F.: CIMMYT. 120 p.
- González Ch, M. M., y Simpson, W. J. 1997. Diversidad Genética en Hongos. *In: Tópicos selectos de Fitopatología: Genética Molecular*. Sociedad Mexicana de Fitopatología (SMF). Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV Unidad Irapuato) 4-23 pp.
- González S, A. 2009. Diagnóstico y Control de Especies de *Aspergillus* Productoras de Ocratoxina A. Tesis de Doctorado. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas. Departamento de Genética. Madrid, España. 236 p.
- Guarro, J., Pujol, I., Mayayo, E. 1999. In Vitro and In Vivo Experimental Activities of Antifungal Agents against *Fusarium solani*. Antimicrob. Agents. Ch. 43:1256-1257.
- Leslie J.F., Zeller K.A., Lamprecht S.C., Rheeder J.P. and Marasas W.F. 2005. Toxicity, pathogenicity, and genetic differentiation of five species of fusarium from sorghum and millet. *Phytopathology*. 95:275-83.
- Leslie, J. F.; and Summerell, B. A. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing: Iowa. USA. 388 p.

- López, B.L. 1990. CEREALES Cultivos Herbáceos Vol.1. Ed. Mundi-Prensa. Córdoba, España. 539 p.
- Martínez S, J. P. y Alvarado G, O. G. 1997. La Reacción en Cadena de la polimerasa en Virología Vegetal. *In*: Tópicos selectos de Fitopatología: Genética Molecular. Sociedad Mexicana de Fitopatología (SMF). Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV Unidad Irapuato) 44-51 pp.
- Nelson, P. E.; Tousson, T. A.; and Marasas, W. F. O. 1983. *Fusarium* species, a illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press, University Park. 236 p.
- O'Donnell, K., Cigelnik, E., y Nirenberg, H.I. 1998. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90:465-493.
- O'Donnell, K. 2000. Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca-Fusarium solani* species complex. *Mycologia* 92:919-938.
- O'Donnell, K., Ward, T.J., Geiser, D.M., Kistler, H.C., y Aoki, T. 2004. Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. *Fungal Genet. Biol.* 41:600-623.
- O'Donnell, K., Sutton, D., Fothergill, A., McCarthy, D., Rinaldi, M., Brandt, M., et al. 2008. Molecular Phylogenetic Diversity, Multilocus Haplotype Nomenclature, and In Vitro Antifungal Resistance within the *Fusarium solani* Species Complex. *J. Clin. Microbiol.* 46:2477-2490.

- Pastor-Corrales, M. A. and G. S. Abawi. Reactions of selected bean germ plasms to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Plant Dis. 71:990-993. SIAP, 2013. <http://www.siap.gob.mx/index.php>.
- Pettitt, T. R. and Parry, D.W. 2001. Effect of temperature on *Fusarium* foot rot of wheat. In: *Fusarium*. Paul E. Nelson Memorial Symposium. APS PRESS. St Paul, Minnesota, USA. 392 p.
- Prescott, J.M. Burnett P.A., Saari E.E., Ransom J., Bowman J., de Milliano W., Singh R.P., Bekele G. 1986. Enfermedades y plagas del trigo una guía para su identificación en el campo. CIMMYT. México, D.F., México. 120 p.
- Ramírez A, N. A. 2013. Factores Bióticos y Abióticos Relacionados con el Engrosamiento del Cladodio del Nopal (*Opuntia ficus indica* (L.) Mill). Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, México. 110 p.
- Romero C, S. 1999. Hongos Fitopatógenos. Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Texcoco, México. 374 p.
- Sánchez C, N. G., Luna R, M., Vázquez T, S. M., Sánchez V, L. R., Santana B, N., Octavio A, P., y Iglesias A, L. G. 2012. Optimización de un protocolo de aislamiento del ADN y de un sistema de amplificación ISSR-PCR para *Ceratozamia mexicana* Brong. (Zimiaceae). Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente, 18:123-133.
- Saunders, D.A., and Hettel G.P. 1994. Wheat in Heat-Stressed Environments: Irrigated, Dry Areas and Rice-Wheat Farming Systems. México, D.F. CIMMYT. 90 p.

- Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos Dirección general de Sanidad Vegetal. 1992. Guía fitosanitaria para el cultivo de trigo. Serie sanidad vegetal, sistema producto trigo. México. 279 p.
- Slafer, G.A., Abeledo, L.G., Miralles, D.J., González, F.G. & Whitechurch, E.M. (2001). Photoperio sensitivity during stem elongation as an avenue to rise potential yield in wheat..En "Wheat in a Global Environment" [Z. Bedo& L. Láng, Eds], ISBN 0-7923-6722-7, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 487-496 pp.
- SIAP. 2015. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. SAGARPA. México. Última consulta: marzo, 2015. Página web: <http://www.siap.gob.mx>
- University of California (UC). 1990. Integrated Pest Management for Small Grains. Division of Agriculture and Natural Resources. Publication No. 3333. 126 p.
- Valadez M, E. y Kahl G. 2005. Huellas de DNA en Genomas de Plantas (Teoría y Protocolos de Laboratorio. Universidad Autónoma de Chapingo. Mundi-Prensa. México, D.F. 147 p.
- Velásquez, R., Medina, M. M. A. y Schwartz, H.F. 2002. Reacción de Seis Genotipos de frijol (*Paseolus vulgaris* L.) a tres Aislamientos de *Fusarium oxysporum f. sp. phaseoli* Kendrick and Synder, Revista Mexicana de Fitopatología 20:146-151.
- Villaseñor. M. H. E., Espitia R. E. 2000. El trigo de temporal en México. Libro técnico No. 1. División agrícola. Secretaria de Agricultura Ganadería y

- Desarrollo Rural. Instituto nacional de Investigaciones Forestales; Agrícolas y Pecuarias, Centro de Investigación regional de Centro Campo experimental Valle de México. 15.p.
- Wall, P. 1987. Central and South America. In: Wheat Production Constraints in Tropical Environments. Klatt, A. R. (ed.). CIMMYT. Mexico, D. F. 410 p.
- Wayne, P. M. 2008. Biotic and abiotic factors associated with *Fusarium* ear rot of maize caused by *Fusarium verticillioides*. Graduate Theses and Dissertations. Iowa State University. Iowa, USA. 161 p.
- Wiese, M. V. 1987. Compendium of wheat diseases. Second Edition. APS PRESS. 112 p.
- Weising, K., Nybom, H., Wolff, K. and Kahl, G. 2005. DNA fingerprinting in plants, principles, methods and applications. 2a. Edición. CRC Press. Taylor & Francis Group. USA. 444 p.
- Wilcoxson, R.D., and Saari E.E. 1996. Bunt and Smut Diseases of Wheat: Concepts and Methods of Disease Management. Mexico, D.F.: CIMMYT.
- Zhang, N., Castlebury L.A., Miller, A.N., Huhndorf, S.M., Schoch, C.L., Seifert, K.A., Rossman, A.Y., Rogers, J.D., Kohlmeyer, J., Volkmann-Kohlmeyer, B., Sung, G.H. 2006. An overview of the systematics of the Sordariomycetes based on a four-gene phylogeny *Mycologia* 98: 1076-1087.

APENDICE

Cuadro 17. Análisis de varianza efectuado a la altura de planta, con el programa SAS versión 8.

The GLM Procedure					
Dependent Variable: altu					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	27	51.7060714	1.9150397	1.63	0.0478
Error	84	98.7450000	1.1755357		
Corrected Total	111	150.4510714			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	altu Mean	
	0.343674	5.731746	1.084221	18.91607	
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	27	51.70607143	1.91503968	1.63	0.0478

Cuadro 18. Análisis de varianza efectuado a la longitud de raíz, con el programa SAS versión 8.

The GLM Procedure					
Dependent Variable: raiz					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	27	92.6431250	3.4312269	3.03	<.0001
Error	84	95.2425000	1.1338393		
Corrected Total	111	187.8856250			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	raiz Mean	
	0.493083	11.21600	1.064819	9.493750	
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	27	92.64312500	3.43122685	3.03	<.0001

Cuadro 19. Análisis de varianza de la severidad de la enfermedad con el programa SAS versión 8.

The GLM Procedure					
Dependent Variable: severi					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	27	7125.026786	263.889881	9.65	<.0001
Error	84	2297.250000	27.348214		
Corrected Total	111	9422.276786			
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	severi Mean	
	0.756190	44.33837	5.229552	11.79464	
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	27	7125.026786	263.889881	9.65	<.0001