



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

**DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA
AGRÍCOLA**

**VARIABILIDAD GENÉTICA DE CEPAS DE *Fusarium
oxysporum* f. sp *ciceris* mediante RAPD-PCR EN EL
BAJÍO, MÉXICO**

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

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

BIBLIOTECA CENTRAL U. A. CH.

PRESENTA:

ARTURO LUNA PAEZ

JUNIO DEL 2002

CHAPINGO, ESTADO DE MÉXICO



B113 97 586

VARIABILIDAD GENÉTICA DE CEPAS DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*
MEDIANTE RAPD-PCR EN EL BAJÍO, MÉXICO

Tesis realizada por Arturo Luna Paez bajo la dirección del Comité Asesor
indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener
el grado de:

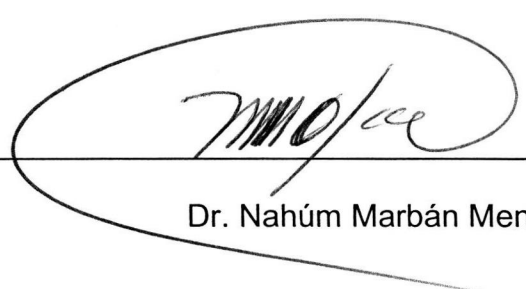
MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

DIRECTOR:



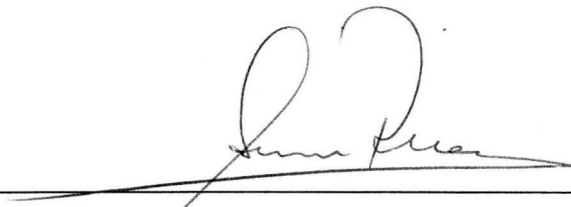
Dra. Ernestina Valadez Moctezuma

ASESOR:



Dr. Nahúm Marbán Mendoza

ASESOR:



Dra. Hilda Victoria Silva Rojas

39679

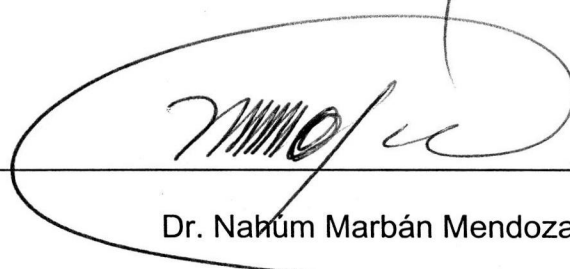
VARIABILIDAD GENÉTICA DE CEPAS DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*
MEDIANTE RAPD-PCR EN EL BAJÍO, MÉXICO

El jurado que revisó y aprobó el examen de grado de Arturo Luna Paez autor de la presente tesis de Maestría en Ciencias en Protección Vegetal estuvo constituido por:

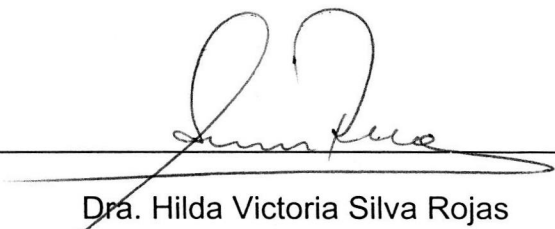
PRESIDENTE: _____


Dra. Ernestina Valadez Moctezuma

ASESOR: _____


Dr. Nahum Marbán Mendoza

ASESOR: _____


Dra. Hilda Victoria Silva Rojas

DEDICATORIAS

Con Cariño y Respeto para mis Abuelitos †Lino Paez Valencia, †Jovita Belmonte Cano, †Dimas Luna Rodríguez y Petra Palma Palo Alto.

Con todo mi Amor para mis Padres Sr. **Plácido Luna Palma** y Sra. **Gloria Paez Belmonte** por su cariño y cuidados que han tenido para conmigo.

Con cariño para mis Hermanos: Carmen, Rosa, Juan, Maribel, Beatriz y **Margarita Luna Paez** por su comprensión.

Para mis Sobrinos: Carlos, Hugo, Luis, Luz, Lorena, Diana, Jorge, †Lupita, Eduardo, Fernando, Javier, Griselda y Sergio con especial cariño.

Con gran afecto para mis Cuñados: Esteban, Juana, Gilberto y Ricardo.

Para **María del Carmen Siles Rosales** como un pequeño homenaje, en recompensa por su invaluable ayuda para la realización de este trabajo y en general por todo lo que ha tenido que hacer por mí, deseándole de verdad siempre lo mejor para ella.

Para **Angel L. S.** por ...

A los señores Miguel Siles y Faustina Rosales, en correspondencia por cualquiera que sea su sentimiento hacia mí; y en retribución a sus atenciones.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo y la confianza depositada para realizar este trabajo.

A la Universidad Autónoma Chapingo, que gracias al apoyo que brinda a cada uno de sus estudiantes, me ha permitido concluir una Maestría en Ciencias.

Al Departamento de Parasitología Agrícola por el apoyo brindado.

Al Departamento de Fitotecnia por las facilidades para la realización de este trabajo en el Laboratorio de Biología Molecular.

A la Dra. Ernestina Valadez Moctezuma con profundo afecto y admiración, por su apoyo y confianza hacia mi persona. Confiando en mantener su amistad.

Al Ph. D. Nahúm Marbán Mendoza por sus consejos, apoyo y dedicación brindados. Esperando que esta relación sea duradera.

A la Dra. Hilda Victoria Silva Rojas por valioso esfuerzo y las sugerencias aportadas para llevar a buen fin este trabajo.

Al Q. F. B. Ricardo Gaspar Hernández, por su apoyo, su amistad y esa virtud de servicio siempre dispuesto a ayudar. Esperando seguir cultivando su amistad.

A la M. C. María Elisa Alvarado Cano por sus consejos, y por que me ha enseñado que la disciplina también es parte de mi formación como persona.

Al M. C. Ángel Rebollar Alviter por su gran ayuda en la realización del trabajo de campo para este estudio.

A la Sra. Aurora Huerta por su apoyo durante mi estancia en la Maestría.

A todos mis compañeros de la Maestría por su amistad. En especial a Francisco Basaldúa, Arturo, Juan José, Leonel, Gustavo, Claudia y Gladys.

DATOS BIOGRÁFICOS

Arturo Luna Paez nació el 15 de Diciembre de 1974 en Chimalhuacán, Estado de México.

Su formación académica inició con sus estudios básicos en este Municipio y en Celaya Guanajuato. Posteriormente realizó sus estudios de Nivel Medio Básico en su lugar de origen, su formación de Nivel Medio Superior la llevó a cabo en el Colegio de Ciencias y Humanidades Plantel Oriente de la UNAM.

Su educación Superior la realizó en el Departamento de Fitotecnica de la Universidad Autónoma Chapingo, donde obtuvo el grado de Ingeniero Agrónomo Especialista en Fitotecnica.

Curso la Carrera de Operador de Microcomputadoras en el Instituto Pacífico de México, en Chimalhuacán, Estado de México. Donde se le otorgó el Título de Operador de Microcomputadoras.

RESUMEN

Variabilidad Genética de Cepas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* mediante RAPD-PCR en el Bajío, México

Arturo Luna Paez. Maestro en Ciencias en Protección Vegetal.

Parasitología Agrícola, UACH.

Dra. Ernestina Valadez Moctezuma.

Fusarium oxysporum f. sp. *ciceris* es un patógeno que limita la producción del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) a nivel mundial. En la planta enferma se puede observar amarillamiento o marchitez. En México, existe poca información de la variabilidad genética y distribución de este patógeno. El presente trabajo tuvo como objetivo analizar la variabilidad genética de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* mediante polimorfismos del DNA genómico con RAPD-PCR. Se recolectaron plantas con síntomas de marchitez ó amarillamiento en 22 localidades de Guanajuato y Michoacán. Para extracción del DNA se utilizó el protocolo propuesto por Bainbridge *et al.*, (1990). Los iniciadores aleatorios utilizados fueron C-01, C-08, C-11 y C-14 de Carl Roth Company. El perfil de bandas amplificadas fue nítida, reproducible y se detectaron polimorfismos que diferenciaron en siete grupos a los aislamientos analizados con un coeficiente de similitud de 0.70, constatando la variabilidad genética del hongo.

Palabras clave: *Fusarium oxysporum*, *Cicer arietinum*, variabilidad, DNA, RAPD.

ABSTRACT

GENETIC VARIABILITY OF *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* STRAINS USING RAPD TECHNIQUE AT THE BAJIO, MEXICO

Arturo Luna Paez. Maestro en Ciencias en Protección Vegetal.

Parasitología Agrícola. UACH.

Dra. Ernestina Valadez Moctezuma.

The chickpea (*Cicer arietinum* L.) is affected by different pathogens that reduce yields. *Fusarium oxysporum* is among the most important. Plant symptoms involve wilting and yellowing. There is a lack of information on genetic variability and distribution in México; thus the main purpose of this contribution was to analyse the genetic variability of *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* using polymorphism of genomic DNA with the RAPD-PCR technique. Chickpea plants showing disease symptoms were collected at 22 localities in the states of Guanajuato and Michoacan. To extract DNA, the Bainbridge *et al.* (1990) protocol was used. Randomized primers used were C-01, C-08, C-11 and C-14 from Carl Roth. The amplified fingerprints were very clear and reproducible and so were able to detect polymorphism that gave us seven clusters of isolates with a similar coefficient of 0.70. This confirms the genetic variability of *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*.

Key words: *Fusarium oxysporum*, *Cicer arietinum*, variability, DNA, RAPD.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
TABLA DE CONTENIDO	ix
LISTA DE CUADROS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. HIPÓTESIS	2
III. OBJETIVO	2
IV. REVISIÓN DE LITERATURA	2
4.1 Origen y distribución del garbanzo	2
4.2 Importancia del cultivo	3
4.3 Cultivo del garbanzo	8
4.4 Aspectos fitosanitarios	10
4.5 El hongo fitopatógeno <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i>	11
4.5.1 Antecedentes	11
4.5.2 Distribución e importancia	12
4.5.3 Descripción <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i>	13
4.5.4 Síntomas y daños causados por el hongo	16
4.5.5 Control <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i>	18
4.5.6 Formas especiales y razas fisiológicas	19
4.6 Técnicas de caracterización e identificación	21
4.7 Marcadores genético-moleculares	22
4.7.1 Marcadores RAPD	24

4.7.2 Otros marcadores moleculares	27
V. MATERIALES Y MÉTODOS	29
5.1 Recolecta de material vegetal	29
5.2 Aislamiento de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> de garbanzo	31
5.3 Obtención de cultivos monospóricos	32
5.4 Extracción del DNA genómico	33
5.5 Cuantificación y calidad del DNA	35
5.6 Selección de iniciadores Carl Roth serie C	36
5.7 Amplificación con la técnica RAPD	38
5.8 Electroforesis de productos amplificados	39
5.9 Análisis del perfil electroforético generado con RAPD	40
5.10 Elaboración del dendrograma con RAPD	40
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
6.1 Aislamiento e identificación de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i>	41
6.2 Extracción, cuantificación y calidad del DNA	43
6.3 Selección de iniciadores Carl Roth serie C	44
6.4 Productos de amplificación con la técnica RAPD	45
6.5 Electroforesis de los productos de amplificación	46
6.6 Análisis estadístico del dendrograma	50
VII. CONCLUSIONES	56
VIII. LITERATURA CITADA	57

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Principales países productores de garbanzo por la superficie dedicada a este cultivo	4
Cuadro 2. Rendimiento de garbanzo en los principales países productores garbanzo	5
Cuadro 3. Principales países por su producción de garbanzo	6
Cuadro 4. Cantidades por litro de agua para preparar PDA modificado	31
Cuadro 5. Cantidades por litro de agua para preparar medio Czapek-Dox	33
Cuadro 6. Clave correspondiente a los cultivos monospóricos de los aislamientos considerados para la extracción del DNA genómico	33
Cuadro 7. Orden de la mezcla de reacción, concentración y volumen final para la selección de iniciadores Carl Roth serie C	37
Cuadro 8. Programa del termociclador para la reacción de RAPD-PCR	38
Cuadro 9. Concentración inicial, concentración final y volumen total de la mezcla de reacción para cada uno de los iniciadores seleccionados para la amplificación del DNA de 41 aislamientos	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sitios de recolecta del material vegetal infectado con <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i>	30
Figura 2. Síntomas de marchitez en garbanzo infectado por <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i>	41
Figura 3. Síntomas de amarillamiento en garbanzo infectado por <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i>	42
Figura 4. Distribución en campo de por <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i>	42
Figura 5. La figura muestra el sistema radical atrofiado y el tallo necrosado	43
Figura 6. Perfil electroforético de la prueba de calidad del DNA de 73 aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> obtenidos de plantas enfermas.	44
Figura 7. Productos de amplificación de 20 iniciadores Roth que conforman la serie C con el DNA del aislamiento MS8	45
Figura 8. Perfiles electroforéticos son los obtenidos con el iniciador Roth C-11 de los aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i>	47
Figura 9. Perfiles electroforéticos obtenidos con el iniciador Roth C-14 de los aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i>	54
Figura 10. Agrupamiento de 41 aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> aislado de plantas de garbanzo con síntomas de marchitez o amarillamiento, analizados con 5 iniciadores RAPD y agrupados con el método UPGMA	52

I. INTRODUCCIÓN

El género *Fusarium* ha llamado la atención de un gran número de científicos más que cualquier otro grupo de hongos; éste es un género cosmopolita y variable, responsable de numerosas enfermedades de plantas, pudriciones en almacén y micosis tóxica en humanos y animales. No obstante, la volatilidad en su sistemática hace evidente la diversidad del género y su importancia en la producción y almacenamiento de alimentos en todo el mundo (Liddell, 1991).

Fusarium oxysporum f. sp. *ciceris* (Padwick) Synder y Hansen, es un hongo que causa marchitez vascular en el cultivo de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) limitando significativamente la producción en todo el mundo (Tekeoglu, *et al.*, 2000; Tullu, *et al.*, 1999). Este hongo es responsable de causar dos síntomas en el cultivo de garbanzo; uno de ellos se presenta como amarillamiento y el otro como marchitez, respondiendo a la existencia de ocho razas fisiológicas descritas hasta febrero del 2001 que corresponden con la siguiente nomenclatura: raza 0, raza 1A, raza 1B/C, raza 2, raza 3, raza 4, raza 5 y raza 6 (Barve, *et al.*, 2001; Jiménez – Gasco, *et al.*, 2001).

Se sabe que este patógeno forma parte de un complejo de hongos que atacan al cultivo del garbanzo y que los nematodos también contribuyen a la expresión de los daños, reportándose que cuando especies del género *Meloidogyne* anteceden al ataque de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, la manifestación de los daños es mayor, rompiendo incluso la resistencia de variedades reportadas

como resistentes (Thakar, *et al.*, 1986; Goel y Gupta, 1986; Updhyay y Dwivedi, 1987 y Kumar, *et al.*, 1988).

No obstante lo anterior, en México existe poca información acerca de la variabilidad existente de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, así como su distribución en las áreas donde se produce el garbanzo que pueda responder a la presencia de razas. Por esta razón, se hacen necesarios estudios de variabilidad genética y de distribución del patógeno en esas regiones que sienten las bases para investigaciones futuras afín de hacer más eficiente el proceso de producción de este cultivo.

II. HIPÓTESIS

El hongo fitopatógeno *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* presenta variabilidad genética en la zona del Bajío.

III. OBJETIVO

Analizar la variabilidad genética de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* mediante polimorfismos del DNA genómico.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Origen y distribución del garbanzo

El nombre *Cicer* es de origen latino, derivado de la palabra preindogermana *kickere* usada por antiguas tribus del norte de Grecia y *arietinum* que tal vez corresponda a la traducción del griego *krios* que significa carnero, aludiendo a

la forma de la semilla de cabeza de carnero (aries). El género *Cicer* es originario del suroeste de Turquía de la zona limítrofe con Siria, pero Vavilov establece dos centros primarios, el suroeste de Asia y la cuenca del Mediterráneo (De miguel 1991).

Se distinguen dos grupos principales de garbanzo; el grupo "kabuli" (blanco) que llegó a la India a través de Afganistán, cuyo nombre hindú es kabuli chana, en donde chana significa garbanzo y kabuli alude a Kabul capital Afgana; y el garbanzo tipo "desi" que significa local (De miguel 1991).

En el siglo XVI los españoles y portugueses, introducen el garbanzo a Sudamérica y América central, encontrando principalmente en México, condiciones favorables para su producción. Actualmente, se considera un producto de gran importancia en la balanza comercial y hasta hace pocos años ha experimentado un desarrollo en el sur de E. U. (De miguel 1991).

4.2 Importancia del cultivo

El garbanzo es una de las más importantes leguminosas de grano en el mundo y la primera en la región mediterránea, cultivándose en varios países del orbe (Cuadro 1).

Cuadro 1. Principales países productores de garbanzo por superficie dedicada a este cultivo

País	Superficie sembrada en hectáreas			
	1998	1999	2000	2001
India	7563000	8469100	6305100	4883000
Pakistán	1102300	1076900	971800	901000
Turquía	630000	600000	575000	575000
Irán	592055	574559	550000	550000
Canadá	38400	139000	283000	339000
Australia	265000	205000	217955	230000
Etiopía	179880	184790	222910	222910
Myanmar	109363	101332	129424	164378
México	68000	137142	134909	136000
Siria	108012	50700	101434	87134
Mundo	11250469	12038858	9968944	8582102

Fuente: FAO, 2001.

México cuenta con una gran variedad de climas y suelos, por lo que es posible cultivar una amplia gama de productos agrícolas con excelentes rendimientos y cumpliendo con los estándares de calidad que exige el mercado internacional. Uno de estos productos es el garbanzo, el cual es considerado como el mejor del mundo (ASERCA, 1997).

La experiencia sobre esta leguminosa, representa un claro ejemplo de las posibilidades que tienen los productos nacionales en el mercado internacional. Con una tradición de muchos años, tanto el sector productivo como el comercial, han ido definiendo estrategias y programas que han resultado favorables frente a nuestros principales competidores como Turquía y Australia.

El cuidado que han tenido tanto productores como comercializadores en mantener la calidad del producto, los altos rendimientos (cuadro 2), la mecanización tanto en condiciones de riego como de temporal en algunos casos, así como la estrecha vinculación entre el sector productivo y el de investigación, ha permitido que en la actualidad el 95% de la superficie nacional cultivada de garbanzo se realice con variedades generadas en nuestro país.

Cuadro 2. Rendimiento de garbanzo en los principales países productores.

País	Rendimiento (t·ha ⁻¹)			
	1998	1999	2000	2001
China	3.2895	3.3333	3.1008	3.8462
Líbano	2.3102	2.3958	2.4958	2.4242
Israel	1.6972	1.8092	1.8571	1.8769
Egipto	1.7896	1.7304	1.8146	1.8481
Sudán	1.4456	1.6595	1.7241	1.7500
México	1.4468	1.4410	1.7331	1.4706
Chipre	1.2500	1.3000	1.1429	1.4286
Canadá	1.3255	1.4173	1.3675	1.3274
Grecia	1.3163	1.2195	1.3123	1.2531
Perú	1.1395	1.4129	1.2374	1.2500
Mundo	0.7799	0.7779	0.7864	0.7065

Fuente: FAO, 2001.

La excelente calidad del garbanzo que se produce en México, ha llevado a penetrar en mercados muy exigentes como el español. Gracias a los esfuerzos en materia de investigación genética y comercialización, nuestro país se ha convertido en un importante exportador del grano; de manera que las exportaciones mexicanas de garbanzo han sido en los últimos tres años las siguientes: en 1999 alrededor de 90 millones de dólares, para el 2000

ascendieron a 110 millones de dólares y en el 2001 fueron cerca 128 millones de dólares (SIAP, 2002).

La producción comercial del garbanzo lleva más de 50 años en nuestro país. A pesar de ser un cultivo que no cubre grandes superficies, su importancia radica en que es un producto que se destina en mayor medida al mercado internacional. El garbanzo mexicano se ha ubicado como el mejor del mundo no sólo por su alta calidad, sino también por la capacidad que ha tenido para introducir diversas variedades al mercado; lo que le ha permitido llegar a más de 18 países. Actualmente México ocupa el sexto lugar en la producción mundial de esta leguminosa (cuadro 3).

Cuadro 3. Principales países productores de garbanzo en el mundo.

País	Producción (t)			
	1998	1999	2000	2001
India	5562337.2	6168914.97	4608975.1	3075976.1
Turquía	544260	507976	489834	489834
Canadá	46171.39	178698.7	351047.7	408195
Pakistán	695836.41	633065.09	512057.95	360118.7
Australia	145136	169627.7	208633	217704
México	89321.23	179266.54	212088.14	181420
Mundo	7958638.69	8495562.06	7111478.05	6043971.92

Fuente: FAO, 2001.

El garbanzo es un producto con un alto valor nutritivo, cuyo contenido de proteína es de 19.7%, 60.7% de carbohidratos, 6.0% de grasa y minerales como fosfatos, hierro y calcio, superando en contenido proteico al huevo y a la leche, e igualando casi a la carne de res; además contiene vitaminas del

complejo B. Sin embargo, su valor nutrimental como el de todas las leguminosas, decrece con el tiempo. Su consumo es de formas muy diversas, inclusive, a veces los granos se tuestan para usarlos como sustituto del café. La planta se cultiva también como forraje ya que es muy apreciada por los animales, e influye en la producción y calidad de la leche (ASERCA, 1997; Microsoft, 2001).

Es por ello que ante los altos índices de desnutrición que enfrenta nuestro país, así como muchas de las economías emergentes; se debe fomentar de manera decidida su cultivo a fin de que forme parte de la dieta, pues es más económico y nutritivo.

Desde 1961, en México se iniciaron los trabajos de mejoramiento genético del garbanzo, dirigidos principalmente al garbanzo forrajero. Posteriormente, los trabajos en el garbanzo blanco dieron lugar a las primeras variedades mejoradas obtenidas por selección individual, siendo estas: Unión, Angostura, Culiacán 860 y Sinaloa. Durante la segunda parte de la década de los setenta y primera de los ochenta se obtuvieron otras variedades como Surutato 77, Sonora 80 y Santo Domingo 82, las que además de tener alto rendimiento y calidad de grano, presentan un buen nivel de resistencia al ataque de *Fusarium* spp. Cabe señalar que la resistencia se obtuvo de líneas de garbanzo forrajero, cruzadas con variedades comerciales de garbanzo blanco (Valadez, 2000).

4.3 Cultivo del garbanzo

El garbanzo es una herbácea de la familia de las leguminosas. Las plantas tienen hojas imparipinnadas, flores axilares, solitarias y pedunculadas, de color blanco a violáceo y vainas que encierran dos semillas generalmente. La planta alcanza unos 60 cm de altura y las semillas tienen forma esférica, debido al grosor de los dos cotiledones que la forman.

Su clasificación taxonómica la ubican en la familia *Fabaceae* subfamilia *Papilionoideae* tribu *Cicereae* género *Cicer* y una docena de especies de las cuales *C. arietinum* L. es la más importante en el ámbito comercial. Pero se reconocen dos variedades botánicas *C. arietinum* var. *fuscum* o *vulgare* de flores violáceas o rosadas y semillas de color castaño rojizo, que corresponden al tipo forrajero; mientras que el garbanzo blanco corresponde a *C. arietinum* var. *macrocarpum* de flores blancas y semillas de color claro se dedica al consumo humano (Mateos 1996; Microsoft, 2001).

El género contiene plantas anuales y perennes de tallos ramificados, erectos o rastreros y las flores varían de color blanco, verdoso, rosa, violeta o azul. En ocasiones de 1 a 5 flores pueden estar dispuestas en racimos, pero por general habrá de 1-3 semillas. El ciclo varía de 90-180 días según las condiciones climáticas, el cultivo se ubica dentro del grupo de plantas de día largo y con temperaturas de 15-25°C, soportando la mínima de -13 °C y máxima de 33 °C; además es bastante sensible a la falta de aereación (Mateos, 1996).

El garbanzo tipo kabuli presenta granos de tamaño medio a grande más o menos redondeados y arrugados de color claro semejando una cabeza de carnero; y el tipo desi presenta granos de tamaño pequeño, de formas angulares y color amarillo a negro. Un tercer tipo ha sido identificado, llamado Goulabi que se caracteriza por tener granos de tamaño pequeño a mediano, lisos y redondeados de color claro, muy parecidos a los chícharos (De Miguel, 1991).

En México el garbanzo se cultiva principalmente en el ciclo otoño-invierno; el que se destina a consumo humano se produce bajo riego y el forrajero en temporal (Mateos, 1996). En Sinaloa (principal estado productor), la época de siembra para el garbanzo blanco es en el periodo de noviembre y diciembre; mientras que la de cosecha es abril a junio. De esta forma la producción mexicana de garbanzo blanco sale al mercado internacional durante el bimestre mayo-junio, mientras que la producción española aparece en julio y la turca en septiembre. El garbanzo de temporal se siembra con las últimas lluvias de verano que coinciden con octubre y noviembre para cosechar en abril-mayo en el Bajío.

El proceso productivo del garbanzo en la década de los noventa, registró algunos aspectos que son importantes mencionar: a) esta leguminosa se concentró en la zona noroeste del país durante el periodo de 1990-1995. Esta zona aportó el 70.84% de la superficie sembrada, el 69.61% de la cosechada y el 69.74% de la producción total del país. b) la zona del Bajío aportó el 26.41%

de la superficie cosechada, el 26.22% en sembrada y 28.23% de la producción total. De esta manera la ubicación de las zonas productoras de garbanzo blanco está prácticamente bien definida: por un lado encontramos la zona noroeste, la del Bajío y la producción restante se distribuye en siete entidades más, situadas en diversas regiones del país: Hidalgo, Guerrero, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Veracruz y Zacatecas (ASERCA, 1997).

La zona noroeste está conformada por tres entidades: en primer lugar se encuentra Sinaloa, le sigue en importancia el estado de Sonora, que es la entidad con el promedio de productividad más alto en la zona noroeste con $1.55 \text{ ton} \cdot \text{ha}^{-1}$ y el tercer estado es Baja California Sur. La zona del Bajío, que es la segunda en importancia, comenzó a disminuir su participación en la superficie sembrada y en consecuencia también en la producción a partir de 1984. Las entidades que destacaron durante la década pasada son principalmente Jalisco, Michoacán y Guanajuato.

4.4 Aspectos fitosanitarios del cultivo

Dentro de los factores limitantes para la producción del garbanzo, la fitosanidad es un aspecto muy importante, ya que se han reportan 67 hongos, 3 bacterias, 22 virus y 80 nematodos que le atacan en campo (Cámara, 2001); además de insectos plaga como gusanos trozadores, minador de la hoja, gusano soldado y gusano de cápsula (Mateos, 1996).

La rabia es una enfermedad causada por un complejo de hongos que atacan la raíz de la planta, en donde predomina *Fusarium*, la infección se da cuando la planta es pequeña o al alcanzar la madurez; normalmente la enfermedad no se encuentra distribuida uniformemente en campo sino en manchones.

Otros hongos fitopatógenos importantes involucrados en la sanidad del cultivo son *Fusarium solani* (Martt) Apple and Wr. (marchitez descendente), *Rhizoctonia solani* kuehn. (Pudrición radical), *Macrophomina phaseolina* (Maubl) Ashles. (pudrición seca) y *Sclerotium rolfsii* Sacc. (pudrición sureña) que están presentes todo el ciclo, pero que pueden manifestarse en alguna etapa (Mateos, 1996). Otras enfermedades que se presentan son la roya causada por *Uromyces cicer-arietini* (Gagnon) Juez, que se presenta cuando el cultivo está en cosecha; *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary (moho blanco) y *Botritis cinerea* Pers. ex. Fr. (moho gris) que se presentan en condiciones de alta humedad, además de *Peronospora* spp (mildiu velloso), *Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Pythium* (pudrición de la semilla, secadera o Damping off) (INIA, 1979).

4.5 El hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*

4.5.1 Antecedentes.

La marchitez del garbanzo causada por *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, se reportó por primera vez en la India (Padwick, 1940; citado por Kelly, *et al.*, 1998) causando una rápida flacidez, desecación y amarillamiento progresivo en plantas infectadas. A partir de entonces el hongo se ha reportado en todas las

áreas donde se cultiva garbanzo, incluyendo México. Butler (1918) reportó a *Fusarium* como responsable del marchitamiento del garbanzo. Prosad y Padwik (1939) reportaron a *Fusarium* sp. como agente causal de la marchitez del garbanzo y Erwin (1958) lo nombró *Fusarium lateritium* (Perales, 2000).

F. lateritium (Nees) Synder y Hansen, posee formas saprófitas y parásitas de árboles forestales, así como otras tres formas patogénicas que afectan leguminosas, entre ellas *F. lateritium* f. sp. *ciceris* (Padwik) Erwin que ataca al garbanzo (Romero, 1993).

4.5.2 Distribución e importancia

Todas las especies del género *Fusarium* son igualmente exitosas como saprófitos y como parásitos de plantas, encontrándose desde los trópicos hasta los círculos polares (Liddell, 1991). Este hongo habita comúnmente en el suelo; pero tiene además la capacidad para crecer y sobrevivir sobre materia orgánica (Edel, et al., 1995).

Dentro de cada especie de *Fusarium* existe un rango de variación en las características morfológicas; y no es inusual encontrar para una especie particular, por ejemplo *F. oxysporum*, que cepas de este hongo aislado de una especie particular de plantas o de suelo de un área geográfica conocida, presenten diferencias con respecto a aislamientos de otra área o una cepa diferente del mismo hongo (Windels, 1991).

4.5.3 Descripción de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*

En la naturaleza existen hongos que rara vez o nunca se reproducen sexualmente, por lo que se les ha denominado hongos imperfectos o Deuteromycetes; sin embargo, bajo condiciones muy especiales se puede lograr la reproducción sexual obteniendo ascas o basidios, por lo que los hongos imperfectos suelen ser las fases conidiales de los Ascomycetes y raramente de los Basidiomycetes. En opinión de algunos autores, esta característica se debe a que se ha perdido la capacidad de reproducción sexual; no obstante en la naturaleza, sobreviven sin necesidad de conidios de origen sexual. Por tal razón, los Deuteromycetes son una forma-clase que agrupa los estados imperfectos de los hongos. *F. oxysporum* pertenece a esta clase y está ubicado en el orden Moniliales, que se reconocen por producir conidios en conidióforos (Romero 1993). Sin embargo, Kendrick en el 2000 no considera en la clasificación actual de los hongos a los Deuteromycetes.

Un problema fundamental en la identificación de *Fusarium* es que los miembros del género varían ampliamente en características morfológicas y patogénicas como la virulencia, y estos criterios son usados en los sistemas taxonómicos. Los taxones reconocidos por el Código Internacional de Nomenclatura Botánica (ICBN por sus siglas en inglés), están basados en las características morfológicas de los individuos e incluyen sección, especie y variedades. Aunque algunas divisiones entre las especies de *Fusarium* están basados en la fisiología como las formas especiales y razas, ó en genética como los grupos de

compatibilidad vegetativa, no están reconocidos por el código con base en el artículo 4.3 (Windels, 1991).

El género *Fusarium* fue descrito por Link en 1915 quien observó conidióforos alargados en forma de botella, con ramas a intervalos regulares o verticiladas, septados, individuales o agrupados en esporodoquios; conidios de dos tipos: microconidios elípticos o piriformes, unicelulares o bicelulares, en cabezuelas o en cadenas; macroconidios falcados en forma de media luna o elípticos, con dos a nueve septas, ápice puntiagudo, roma o en forma de gotero, base puntiaguda, roma o en forma de pie; clamidiosporas, que cuando se producen son globosas, ovales o piriformes, individuales o en grupos, intercalares o terminales, uni o bicelulares, lisas o rugosas, generalmente de color marrón (Romero, 1993).

Fusarium es un hongo muy diverso y variable, prueba de ello es la inestabilidad en la sistemática del grupo (Liddell, 1991). En un principio, los caracteres utilizados por Wollenweber y Reinking para separar secciones de *Fusarium*, fueron la presencia o ausencia de microconidios, su forma, presencia o ausencia de clamidiosporas, la ubicación intercalar o terminal de las mismas, forma de macroconidios y forma de las células basales del pie del macroconidio. Las secciones se dividieron en especies, variedades y formas con base al color del estroma, presencia o ausencia de esclerocios, número de septos del macroconidio y sus dimensiones. En la sección *Elegans* se ha puesto el mayor énfasis en la medición del largo y ancho del macroconidio; ya

que algunas especies, variedades y formas se diferencian por pocos micrómetros en las dimensiones, así como el número de septos del macroconidio (Nelson, *et al.*, 1983).

F. oxysporum es la especie de este género más ampliamente distribuida y perjudicial a la agricultura, atacando a diversos cultivos de gran importancia económica. Generalmente las plantas enfermas muestran clorosis, achaparramiento, coloración marrón del xilema y comúnmente marchitez. Este hongo persiste en el suelo por lo que una vez establecido, permanece allí indefinidamente (Romero, 1993).

Para identificar la especie *F. oxysporum*, además de considerar las generalidades anteriores, se toman en cuenta las estructuras reproductoras. Generalmente los conidios son fusiformes o inequilateralmente fusiformes a elipsoidales; los microconidios son alantoides de color pálido, beige, azul, púrpura o marrón que se forman a partir de conidióforos laterales cortos, generalmente en fialides agrupadas lateralmente, que miden de 5-12 x 2.2-3.3 μm . Los macroconidios son escasos en algunas cepas, se producen en conidióforos ramificados, son equilateralmente falcados o cilíndricamente puntiagudos, poseen paredes delgadas generalmente con 3-5 septas, un poco curvos en el ápice y pedicelados en la base. Si poseen 3 septas, éstas miden de 27-46 x 3-5 μm , si son 5, miden 35-60 x 3-5 μm , pero si poseen 6-7 septas son de 50-66 x 3-5 μm ; pero es más común encontrar macroconidios con 3

septas. Las clamidiosporas se encuentran intercaladas o terminales en ramificaciones laterales cortas en el micelio. El micelio es estriado, fibroso o velloso, con coloraciones que van del anaranjado al violeta (pero algunas cepas no presentan pigmentación); sin embargo, esas diferencias morfológicas entre cepas, son independientes de la agresividad de cada una y de su especialización en una u otra variedad de cultivo (Cepeda y Ayala, 1984).

F. oxysporum aparte de ser el miembro de mayor importancia económica del género, presenta gran dificultad para ser separado en especies, sobre todo después de haber sido mantenidos por algún tiempo en medios artificiales. Esto gradualmente permitió comprender que la patogenicidad selectiva de los aislamientos de la sección *Elegans* no están necesariamente enlazados a las variantes morfológicas. (Booth, 1971).

4.5.4 Síntomas y daños causados por el hongo

En el análisis de variabilidad entre aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* realizado por Om-Gupta, *et al.* (1986) se encontraron diferencias morfológicas y en patogenicidad entre aislamientos, por lo que sugirió la existencia de patotipos entre los estudiados.

El análisis de siete razas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* por Kelly *et al.*, en 1994, revelaron la existencia de dos patotipos diferentes, uno causando amarillamiento y otro marchitez. Ellos encontraron que las plantas con marchitez les precede una clorosis severa y flacidez, además de una

decoloración vascular y muerte prematura en un promedio de 20 días después de la inoculación; y las que presentan el síndrome de amarillamiento progresivo, les precede una clorosis foliar con decoloración vascular y mueren alrededor de los 40 días posteriores a la inoculación.

Kaur, *et al.*, (1987) reportaron para plantas infectadas con este hongo, una coloración marrón en los sitios de infección y además determinaron que los sitios de acción de las toxinas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* es la inhibición de la síntesis de RNA y con ello la correspondiente ausencia de proteínas.

Cepeda y Ayala, (1984), señalaron que la marchitez en garbanzo puede presentarse en cualquier etapa del cultivo y que los síntomas de la enfermedad son atribuidos principalmente a las toxinas secretadas por el hongo y el ataque se ve favorecido por temperaturas de 24-27°C. Se sabe que los daños que causa *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* se debe a la producción de enzimas pectatoliasas (PL) y poligalacturonasas (PG) con actividad extracelular. La cantidad y tipo de enzimas depende de las razas fisiológicas del hongo, por ejemplo, Perez-Artes y Tena, (1989) en un estudio con las razas 0 y 5 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, encontraron que la raza 0 produjo el doble de la cantidad de enzimas que produce la raza 5. Por su parte el tiempo transcurrido para la producción de PG fue similar en ambas razas, mientras que las PL fueron precedidas por PG en la raza 5, en tanto que la raza 0 presentó un retraso con respecto a PG de 5-7 días (Pérez-Artes y Tena, 1990). Estos mismos autores encontraron respecto a los cultivares, que los susceptibles para

ambas razas y los resistentes a la raza 0, pero susceptibles a la raza 5, presentaron altos índices de síntesis de enzimas similares para cada raza; mientras que las enzimas PG y especialmente las PL en plantas resistentes, fueron bajas para ambas (Pérez-Artes y Tena, 1989).

Conci, *et al.*, (1985) reportaron que *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* se transmitió vía sistemática en la semilla, en un experimento con semillas sanas.

4.5.5 Control de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*

De manera general las variedades resistentes son el mejor método para contrarrestar los daños ocasionados por *F. oxysporum*. Por su parte, los fungicidas sólo abaten temporalmente la población del hongo, ya que muchos conidios evaden la acción fungicida o por que éstos mismos actúan como agentes mutagénicos promoviendo la resistencia (Romero, 1993). El control de la marchitez por *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en un estudio realizado por Das (1987) evaluando ocho tratamientos a la semilla, encontró que el mejor control fue Agallol (2-methoxyetilmercurio cloro), mientras que Brassicol (quintozene) presentó los mayores rendimientos.

Los daños que ocasiona este hongo se suprimen bajo condiciones alcalinas y la marchitez es menos severa en suelos arenosos. Por otro lado, temperaturas entre 24 a 27°C favorecen el crecimiento y desarrollo del hongo, así como la humedad del suelo superior a 25% (Cepeda y Ayala, 1984).

Hasta ahora el principal método de control es el genético mediante variedades resistentes, encontrando según Harjit-Singh *et al.*, (1987) que los cultivares resistentes presentan alelos recesivos y que juntos confieren resistencia completa. No obstante cada cultivar presenta ese gen en un locus diferente.

Bhatti (1992) en su estudio de la influencia de la densidad del suelo, analizaron la compactación del suelo y reportaron que la compactación excesiva reduce el crecimiento y producción de muchas especies de cultivos incluyendo garbanzo, con lo cual se incrementa la incidencia y severidad de la pudrición de la raíz, debido a la reducción en su crecimiento y distribución de la misma. Esto favorece el incremento de exudación y del contacto exitoso entre hospedante y patógenos. Para el caso de garbanzo, hubo marchitez y muerte de plantas en suelos infestados con *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en suelos compactados como sueltos; no obstante, la población del hongo se incrementó significativamente en suelos compactados; estoa mismoa autores también reportaron que los ápices de los pelos radicales son puntos de infección.

4.5.6 Formas especiales y razas fisiológicas

Day citado por Tosa (1992) distinguió dos tipos de interacción hospedante-patógeno: (a) el primero determina que una planta sea o no hospedante para un parásito y la otra (b) determina la especificidad gen a gen. Esta última es muy necesaria en la compatibilidad básica, donde existe un estado de armonía entre el hospedante y el patógeno desarrollado por un periodo de tiempo.

Originalmente se decía que las formas especiales eran específicas para un hospedante y se nombraban de acuerdo al nombre en latín del hospedante; en consecuencia la forma especial que atacaba al chícharo se designaba forma especial *pisi*, al que atacaba al garbanzo se designaba *ciceris*; pero en realidad el hospedante específico no ocurre para todas. Algunas formas especiales por ejemplo *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* causante de la marchitez en algodón, es patógeno de plantas de la familia Malvaceae, Solanaceae y Fabaceae. Otra característica que complica el concepto es el temprano establecimiento de éste que condujo a diversas formas especiales, que después se encontraron como razas de otras formas especiales (Windels, 1991).

Algunas cepas de *F. oxysporum* son responsables de síntomas de marchitez vascular de plantas de importancia económica. Varias cepas patogénicas muestran un alto nivel de especificidad de hospedantes y de esa manera se clasifican en formas especiales y razas. Esas razas patogénicas no son identificables usando características fenotípicas y es aquí donde las herramientas moleculares se han usado para distinguir la diversidad genética entre cepas patogénicas de *F. oxysporum*, con el objetivo de determinar relaciones genéticas entre formas especiales (Edel *et al.*, 1995).

Se considera raza fisiológica a la subdivisión de una especie de parásitos caracterizados por su especialización sobre un cultivar o varios de una especie hospedante. Las razas fisiológicas son conocidas como patotipos. Su existencia se basa en el principio de que en todos los seres vivos existe variación; y se

define como un grupo de individuos morfológicamente idénticos a la especie, pero se caracterizan por el diferente grado de virulencia sobre individuos de la misma especie. En México, no habían reportes de razas fisiológicas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* hasta que Solís en 1999 citado por Pérez, 2000 reportó a las razas 3 y 4 de este patógeno mediante inoculación en 11 plantas diferenciales con diferentes cepas del hongo aislado de plantas enfermas de Guanajuato, reportándose presentes en Celaya y Yuriria (Pérez, 2000). El mismo autor encontró que materiales resistentes en ciertas regiones garbanceras, pueden tener un comportamiento diferente en otras regiones debido a la variabilidad del patógeno; pero es posible suponer que este comportamiento podría deberse también a condiciones ambientales favorables o desfavorables para el desarrollo del hongo.

4.6 Técnicas utilizadas para la caracterización e identificación de patógenos

El estudio minucioso de la morfología de un patógeno particular, permite inferir una ubicación taxonómica temporal y en contadas ocasiones definitiva. La situación se complica cuando existe diversidad genética amplia en esos patógenos que de lugar por ejemplo, a razas, formas especiales o patovares. Para el caso de hongos, la separación de esas variantes genéticas se ha llevado a cabo generalmente con el uso de plantas diferenciales. Los síntomas manifestados por ese tipo particular de plantas, después de la inoculación mecánica, ha sido una estrategia comúnmente utilizada por los fitopatólogos para la identificación y separación de razas. Esta identificación-separación se

obtiene mediante la distinción de síntomas específicos de la enfermedad que muestra cada hospedante (planta diferencial) al ser inoculado con diferentes aislamientos de un patógeno particular, asimismo se considera el tiempo que tarda la presencia de dichos síntomas (Agrios, 1996; Perales, 2000).

De manera más específica, las variantes genéticas del patógeno pueden separarse con diferentes técnicas moleculares. Algunas de éstas están basadas en análisis bioquímicos, análisis de ácidos nucleicos (como los polimorfismos) o la detección de fragmentos específicos de un genoma particular, o mediante secuenciación del ADN.

4.7 Marcadores genético moleculares

De los muchos desarrollos apasionantes de la investigación, quizá el estudio del DNA es el que ha llamado más la atención; ya que este sencillamente es el responsable de la vida en las diferentes formas que conocemos. Debido al entrecruzamiento y la geografía, poblaciones similares muestran genes comunes, pero con genomas heterogéneos. De esta manera cuando una enfermedad es común a un cierto grupo, se sabe que existe una fuerte influencia genética. Esto indica que el cambio en los factores ambientales es muy importante para el desarrollo de las enfermedades, y que diferentes genes pueden tener una función particular en distintas poblaciones, pudiéndose describir patrones de la enfermedad que muestran comportamientos extremadamente diferentes (Pérez, 1997).

El prerrequisito para un análisis genético es tener herramientas que pueden discriminar entre entidades biológicas con diferentes caracteres genéticamente determinados. Clásicamente esto se ha hecho usando criterios morfológicos patogénicos por tipos de apareamiento y fisiológicos para distinguir entre especies y razas. En hongos aún para discriminar entre especies, esas características suelen ser difíciles y frecuentemente dan resultados erróneos. Aún en niveles taxonómicos bajos, ciertas características distinguibles apropiadas son difíciles o imposibles de encontrar entre aislamientos de una sola especie de diferentes poblaciones. Los marcadores genético-moleculares en cambio, pueden ser aplicados en estos niveles con mayor confiabilidad y simultáneamente permiten medir la variabilidad en múltiples *loci* en cada individuo evaluado.

Se considera marcador a cualquier molécula proteica de DNA o RNA cuya expresión o secuencia química manifiesta cambios. Estos cambios pueden ser detectados de forma directa mediante electroforesis (Campos, 1995; Valadez, 2000). Para su estudio, los marcadores pueden clasificarse en morfológicos, bioquímicos y genético-moleculares. Los marcadores morfológicos se han utilizado ampliamente en estudios de diversidad genética. Para el caso de microorganismos se considera la forma, color, susceptibilidad a fagos o antibióticos y en hongos, el tipo de micelio y forma de sus estructuras reproductivas, entre otras. Los marcadores bioquímicos están referidos principalmente al estudio del polimorfismo de macromoléculas como las isoenzimas y proteínas; y se han utilizado ampliamente para estudios de

filogenética. Estas dos clases de marcadores pueden ser alterados por el ambiente en el que se desarrolle el organismo y dependen casi por completo de la etapa fenológica del mismo; por lo que son reproducibles solo bajo condiciones iguales. Los marcadores genético-moleculares permiten analizar de manera directa los ácidos nucleicos. Las ventajas de esta última clase de marcadores supera ampliamente a las dos primeras; en primer lugar, son reproducibles en cualquier etapa del desarrollo de un organismo, el número de polimorfismos que se pueden detectar es casi ilimitado y existe una gran variedad de técnicas disponibles que son muy versátiles, ya que permiten detectar huellas genómicas, identificar o etiquetar genes, hacer mapas genéticos y lógicamente, diagnosticar enfermedades (Valadez y Kahl, 2000).

4.7.1 Marcadores RAPD

Varios métodos moleculares han sido aplicados para el estudio de aislamientos de hongos fitopatógenos. El análisis RAPD (fragmentos polimórficos de DNA amplificados aleatoriamente), ofrece la posibilidad de detectar polimorfismos sin un conocimiento previo de las secuencias del DNA del organismos en estudio.

La técnica es relativamente rápida y no involucra transferencia tipo Southern, ni radioactividad. La amplificación de los fragmentos polimórficos obtenidos, se llevan a cabo mediante el uso de iniciadores de secuencias aleatorias. Usualmente los RAPD proveen marcadores dominantes, ya que los polimorfismos se detectan mediante la presencia o ausencia de bandas que resultan de inserciones o deleciones en las regiones amplificadas, o a partir de

cambios de bases en el DNA que alteran la unión del iniciador (Valadez, 2000). Los fragmentos amplificados (amplicones) pueden ser visualizados directamente en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio; sin embargo, la amplificación será exitosa solo si el DNA molde contiene sitios de reconocimiento en ambas cadenas en polaridad opuesta y a una distancia de 50-6000 pares de bases en promedio (Valadez y Kahl, 2000). Los patrones producidos son altamente polimórficos permitiendo la discriminación entre aislamientos de una especie si se evalúa con un número suficiente de iniciadores (Valadez, 2000).

Los RAPD se han utilizado con éxito en la caracterización intraespecífica de varios patógenos de plantas; así como para distinguir entre formas agresivas y no agresivas de *Poma lingam*, para estudios de filogenética e identificación de razas específicas de *F. oxysporum* en algodón (Edel *et al.*, 1995; Kelly *et al.*, 1998; Kelly *et al.*, 1994; Valadez, 2000).

Vakalounakis en su estudio sobre diversidad genética de *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* estableció las distancias genéticas basado en los conjuntos de datos binarios para cada aislamiento con la siguiente fórmula: $D = 1 - (B/M)$, donde D representa la distancia genética entre dos aislamientos, B son las bandas RAPD comunes y M es el total de bandas RAPD en esos patrones (Mesquita *et al.*, 1998; Vakalounakis y Fragkiadakis, 1998).

Kelly *et al.*, (1994) aplicaron RAPD para distinguir aislamientos de diferentes patotipos de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*. En el correspondiente análisis los aislamientos se ubicaron en dos grupos (correspondiendo a los patotipos) que fueron bien diferenciados de otras formas especiales y de otros hongos incluidos en el estudio. Estos autores encontraron que los aislamientos que inducen amarillamiento (raza 0, 1B/C) formaron un grupo más homogéneo, comparado con el grupo conformado por los aislamientos que inducen marchitez (razas 1A, 2, 3, 4, 5 y 6). Paralelamente encontraron que un aislamiento clasificado dentro de la raza 0, mantuvo su disimilaridad con los otros aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, observando que este aislamiento se había mantenido en PDA por seis años y en pruebas de patogenicidad no se revelaron síntomas de amarillamiento ni de infección; concluyendo que la posible pérdida de patogenicidad fue resultado de largos periodos de cultivo en medios artificiales, como se ha reportado para el caso de *Fusarium* (Kelly *et al.*, 1994).

Mediante los perfiles de huellas genómicas, se han identificado varios marcadores RAPD que discriminan los patotipos que causan amarillamiento o marchitez de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*; uno de esos marcadores asociados a la inducción del patotipo que causa marchitez es un fragmento de DNA de 1.6 Kb, obtenido con iniciadores de KS Stratagene. Al evaluar otros aislamientos que inducían amarillamiento o marchitez con esos iniciadores, se detectó un fragmento de peso molecular similar; mientras que en los aislamientos que inducían amarillamiento no se detectaron esos fragmentos, así como en otros

hongos probados. Además los iniciadores detectaron la presencia de DNA que induce marchitez en plantas que no mostraban síntomas, estos resultados prueban que *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* puede ser detectado en planta por PCR a partir de tejido vegetal, al menos cuando el patotipo específico marchitez esta presente (Kelly *et al.*, 1998).

4.7.2 Otros marcadores moleculares

Se han desarrollado otras alternativas para la identificación, ubicación taxonómica y filogenia de los microorganismos, que ofrecen ventajas específicas; por ejemplo se ha recurrido al estudio y secuenciación de las regiones ribosomales en el DNA; ya que la información que contienen estas zonas del genoma está siempre dispuesta de la misma forma en todos los procariontes o en los eucariontes, según sea el caso; y porque contienen regiones específicas variables y conservadas, permitiendo discriminar entre los géneros, especies o nivel intraespecífico. (Edel *et al.* 1995; Montero, 2001; Pérez, 1997).

Algunos de los marcadores que se estudian del rDNA son los espacios de transcripción interna (ITS) y las secuencias del espacio intergénico (IGS). Los ITS pueden exhibir variación entre géneros y son usados en la diferenciación de especies, aunque a nivel intraespecífico, la variabilidad en secuencias ITS es generalmente muy baja o no detectable en *F. oxysporum* (Avelange, 1994 citado por Edel *et al.*, 1995). En cambio las IGS, que son secuencias que separan las unidades repetidas ribosomales, han mostrado ser bastante

variables y han permitido discriminar hongos cercanamente relacionados al género *Laccaria* (Edel *et al.*, 1995).

Otra técnica para detección de huellas genómicas con fines de identificación, así como para propósitos taxonómicos, es la reacción en polimerización en cadena basada en secuencias repetidas (rep-PCR). Esta técnica está basada en la amplificación con PCR de secuencias genómicas localizadas entre secuencias repetidas específicas en procariontes. Esos elementos repetidos se conocen como elementos BOX, REP y ERIC. La amplificación de estos elementos permite distinguir fragmentos de DNA de diferentes tamaños a partir de genomas de cepas individuales. La separación por electroforesis genera huellas de DNA altamente específicas que pueden ser comparadas visualmente unas con otras o sometidas a análisis de perfiles asistido por computadora.

Aunque los iniciadores de rep-PCR se diseñaron para elementos repetidos en genomas procariontes, los iniciadores para REP, ERIC y BOX también han funcionado en algunos genomas de hongos y se han utilizado para caracterizar variabilidad a niveles inter e intra específicos de varios géneros en los que está incluido *Fusarium* (Mc Donald, *et al.*, 2000).

Las secuencias repetidas de DNA son una característica común de todos los eucariontes. Algunas de esas secuencias se han usado para diseñar iniciadores que amplifican secuencias interrepetidas y con ello obtener patrones

electroforéticos de especies o cepas específicas. En hongos esta estrategia se ha utilizado para diferenciar especies de *Aspergillus* (Edel *et al.*, 1995).

Edel *et al.*, (1995) encontraron que los elementos ERIC y REP están presentes en *F. oxysporum* y la distribución de éstos es variable para cada cepa. Además estos autores establecieron que de los tres procedimientos evaluados en su trabajo, los que se basaron en PCR pueden ser adaptados para una caracterización en gran escala de *F. oxysporum* como se requiere en estudios de diversidad de poblaciones naturales donde los individuos son numerosos.

V. Materiales y métodos

5.1 Recolecta de material vegetal

La recolección de material vegetal fue dirigido a plantas enfermas en las localidades de: El Calvario, Singuio, La Purísima, INIFAP, Morelia y Cuitzeo en el Estado de Michoacán, Puquichapio, Valle de Santiago, Betania, Salvatierra, Celaya, Jaral del Progreso, Irapuato, Juventino Rosas, Villagrán, Apaseo el Grande, Cortazar, Yuriria y Rincón de Tamayo en el Estado de Guanajuato (Figura 1). Se obtuvieron un total de 112 plantas de garbanzo que manifestaron los síntomas típicos de la enfermedad, marchitez o amarillamiento.

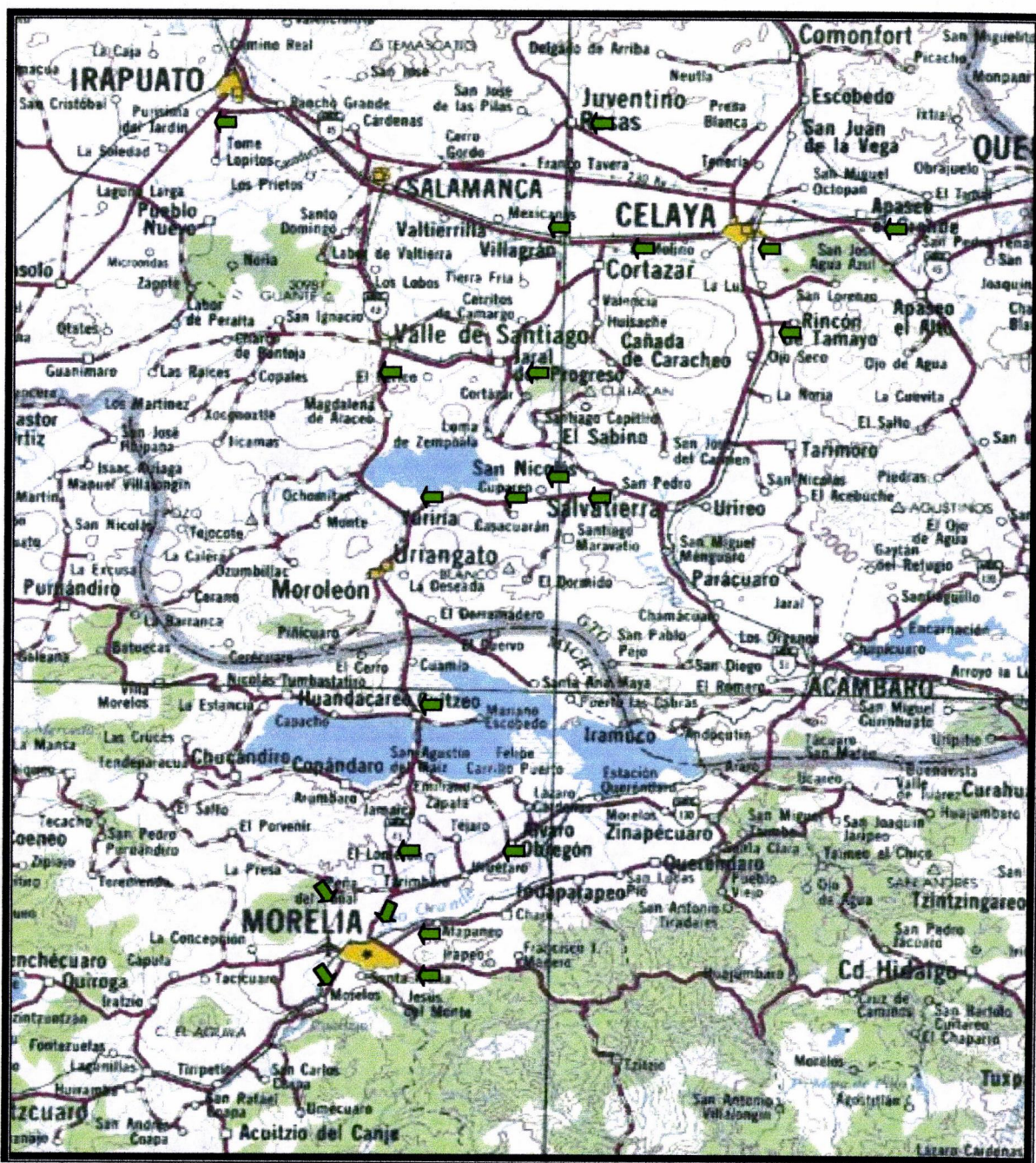


Figura 1. Sitios de recolecta del material vegetal infectado con *Fusarium oxysporum* f. sp. *Ciceris* en el Bajío, México. Tomado de INEGI, 2001.

El procesamiento de las muestras que consistió en el aislamiento, identificación, extracción de DNA, corrimiento de los análisis de PCR, electroforesis y

agrupamiento, se llevaron a cabo en el laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Fitotecnia en la Universidad Autónoma Chapingo.

5.2 Aislamiento de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en garbanzo

De la raíz de las plantas recolectadas con síntomas de necrosis, se realizaron cortes longitudinales y transversales del sistema radical de 5 mm aproximadamente; se trataron con una solución de hipoclorito de sodio al 1% (a partir a una solución stock al 5.25%) por 1.5 min, después se enjuagaron con agua destilada estéril dos veces, se dejaron secar y se sembraron en cajas Petri conteniendo medio PDA (papa, dextrosa, agar) modificado por la recomendación de Nelson *et al.*, (1983). Esta modificación consiste en reducir la cantidad de carbohidratos para disminuir las mutaciones y alteración de la patogenicidad de los aislamientos.

Cuadro 4. Cantidades por litro de agua para preparar PDA modificado.

Productos	Cantidad
Papa blanca limpia	150 g
Dextrosa	15 g
Agar	18 g

El medio se esterilizó en autoclave por 25 min a 20 lb · pulg².

Las cajas Petri se incubaron a una temperatura de 18-25 °C y las colonias se hicieron visibles después de 3 a 5 días, observándose distintas coloraciones del micelio. Se realizó una transferencia por punta de hifa a una caja Petri con PDA

acidificado; esta condición se realizó para limitar el crecimiento de bacterias ya que el ácido láctico es un producto bacteriostático.

5.3 Obtención de cultivos monospóricos

Para los cultivos monospóricos, se obtuvieron macroconidios del hongo en medio de cultivo CLA (carnation leaf agar). Mientras se solidificó el agar – agua en cajas Petri estériles, se agregaron segmentos de hojas de clavel de aproximadamente 1 cm previamente esterilizados dos veces. Se transfirieron por punta de hifa los aislamientos y se incubaron durante 10 días con luz fluorescente.

Después de ese periodo, se tomaron muestras del micelio y se observaron al microscopio tratando de localizar los macroconidios característicos de *F. oxysporum*. Cuando se encontraron presentes estas estructuras, se procedió a realizar diluciones para obtener una baja cantidad de macroconidios, posteriormente se procedió a sembrarlos en cajas Petri con agar – agua para obtener colonias separadas a partir de cada macroconidio.

Después de 24-36 h una colonia de cada muestra se transfirió a frascos conteniendo 100 mL de Czapek – Dox líquido, los cultivos se incubaron bajo luz fluorescente y se agitaron durante 8 - 10 días hasta obtener una cantidad suficiente de micelio para extraer DNA.

Cuadro 5. Cantidades por litro de agua para preparar medio Czapek-Dox.

Reactivos	Cantidades
Sacarosa	30.0 g
Nitrato de sodio (Na NO_3)	2.0 g
Fosfato de potasio (K_2HPO_4)	1.0 g
Sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.5 g
Cloruro de potasio (KCl)	0.5 g
Sulfato de fierro heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.01 g
Agar	18.0 g

5.4 Extracción del DNA genómico

La extracción del DNA se realizó de 41 cultivos monospóricos mostrados en el cuadro 6.

Cuadro 6. Clave correspondiente a los cultivos monospóricos de los aislamientos considerados en la extracción del DNA genómico.

Clave	Estado	Localidad	Cultivo Monospórico (C.M.)
MC 1	Michoacán	El Calvario	1
MC 3	Michoacán	El Calvario	3
MS 6	Michoacán	Singuio	6
MS 8	Michoacán	Singuio	8
MS 9	Michoacán	Singuio	9
MS 10	Michoacán	Singuio	10
MP 14	Michoacán	La Purísima	14
MP 16	Michoacán	La Purísima	16
MI 17	Michoacán	INIFAP	17
MI 19	Michoacán	INIFAP	19
MM 23	Michoacán	Morelia	23
MM25	Michoacán	Morelia	25
MM28	Michoacán	Morelia	28
MM30	Michoacán	Morelia	30
MCu 35	Michoacán	Cuitzeo	35
MCu 38	Michoacán	Cuitzeo	38
GP 41	Guanajuato	Puquichapio	41

Cuadro 6. (Continuación)

GP 42	Guanajuato	Puquichapio	42
GP 43	Guanajuato	Puquichapio	43
GVS 45	Guanajuato	Valle de Santiago	45
GVS 48	Guanajuato	Valle de Santiago	48
GYrB 52	Guanajuato	Yuriria Betania	52
GYrB 55	Guanajuato	Yuriria Betania	55
GSa 61	Guanajuato	Salvatierra	61
GSa 62	Guanajuato	Salvatierra	62
GSa 64	Guanajuato	Salvatierra	64
GSa 65	Guanajuato	Salvatierra	65
GCI 66	Guanajuato	Celaya	66
GCI 67	Guanajuato	Celaya	67
GCI 68	Guanajuato	Celaya	68
GJP 69	Guanajuato	Jaral del Progreso	69
Glp 70	Guanajuato	Irapuato	70
Glp 71	Guanajuato	Irapuato	71
Glp 72	Guanajuato	Irapuato	72
GJR 73	Guanajuato	Juventino Rosas	73
GVg 74	Guanajuato	Villagrán	74
GAG 75	Guanajuato	Apaseo el Grande	75
GCz 76	Guanajuato	Cortazar	76
GYr 77	Guanajuato	Yuriria	77
GYr 78	Guanajuato	Yuriria	78
GRT79	Guanajuato	Rincón de Tamayo	79

El micelio incrementado en medio líquido Czapek – Dox se filtró con la ayuda de un embudo Buchner conteniendo papel filtro. Para la extracción del DNA se utilizó el protocolo propuesto por Bainbridge *et al.* (1990) y modificado por Cámara (2001), para lo cual se maceró 0.1 g de cada cultivo monospórico con nitrógeno líquido, se transfirió a tubos eppendorf de 1.5 mL, se agregaron 600 μ L de solución de lisis (10 mM Tris base-HCl pH 8; 250 mM EDTA·2H₂O pH 8; proteinasa K (Sigma) 200 μ g·mL⁻¹; triton – X100, 0.5%. Se incubaron hasta el día siguiente a 37° C en agitación constante.

Al día siguiente se agregaron 0.15 vol de NaCl al 1.5 M, 0.7 vol del fenol equilibrado, 0.3 vol de cloroformo, se mezclaron por inversión los tubos. Posteriormente se centrifugaron a 1.431g en una centrífuga eppendorf 5810R a 4° C por 20 min. Después, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo cuidando de no tomar la interfase. Se le agregaron 4 µL de RNasa, se incubaron a 37°C por 1h, se le agregó 1 vol de cloroformo y se mezclaron por inversión. Luego se centrifugaron a 1.432g a 4°C por 10 min y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo donde se agregaron 0.54 vol de isopropanol del volumen que se obtuvo de la fase acuosa y se dejó hasta el día siguiente en refrigeración a 4°C para que precipitara el DNA.

Los tubos con DNA precipitado se centrifugaron por 40 min a 1.431g a 4°C por 40 min, una vez formada la pastilla se decantó cuidadosamente el sobrenadante; posteriormente la pastilla se lavó con etanol al 70%, se centrifugó $\pm$ 3 min y se secó por 30 min a 37 °C para después disolver el DNA en 80 µL de TE pH 8.0 (10mM Tris- HCl pH 7.6, 1mM EDTA pH 8).

5.5 Cuantificación y calidad del DNA

Para la cuantificación del DNA se hizo una dilución 1:20 en donde se tomó 1 µL de DNA por 19 µL de agua bidestilada estéril. La lectura se realizó en un espectrofotómetro Perkin Elmer UV/VIS Lambda Bio, a una longitud de onda de 260 nm, con volumen total de la celda de 120 µL.

La concentración se calculó con base en la absorbancia proporcionada en $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, se multiplicó por 50 que es un factor común para la lectura de DNA y por el factor de dilución y este valor se dividió entre 1000 para obtener la concentración en $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$.

$$\left[DNA_{\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}}\right] = \frac{Abs * 50 * 20}{1000}$$

Para determinar la calidad del DNA se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, cargando 10 μL a 0.1 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ en cada pozo mezclados con amortiguador de carga, en una cámara para electroforesis GIBCO BRL. Se dejó correr 1.5 h a 78 volts; después se procedió a colocar el gel en bromuro de etidio 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de Molecular SIGMA Biology por 15-20 min.

Las bandas se fotodocumentaron usando un transiluminador Dual Intensity UVP de luz ultravioleta modelo TS-20 y el programa Kodak Digital Science 1D V.2.0.3. Lo cual manifestó que el DNA fue de buena calidad, altamente puro y no degradado.

5.6 Selección de iniciadores Carl Roth serie C

De la prueba de calidad del DNA se eligió un aislamiento, para seleccionar de entre 20 iniciadores de Carl Roth GMBH + Co., serie C, los que más sitios de reconocimiento tuvieron, pero que a su vez produjeron el patrón de bandas bien

definido. La mezcla de reacción para la evaluación de iniciadores se describe en el cuadro 7.

Cuadro 7. Orden de la mezcla de reacción, concentración y volumen para la selección de iniciadores Carl Roth serie C.

		[] final	1X	21X
			μL	μL
Agua bidestilada			5.35	112.35
dNTP's	200 μM		10.00	210.00
Amortiguador	1X		2.50	52.50
MgCl	1.5 mM		0.75	15.75
Iniciadores ¹	20 pmol		2.00	
Taq-polimerasa	2 U		0.40	8.40
DNA	100 ng- μL^{-1}		4.00	84.00
Total			25.0	

¹ Los iniciadores se colocaron uno a uno en los tubos correspondientes depositando 2 μL por tubo. Todo lo demás se puede realizar en una mezcla previa 21 X.

La reacción de PCR, se llevó a cabo de acuerdo al programa del termociclador para RAPD, pero estos análisis tuvieron la variante de incrementar la temperatura de alineamiento con la finalidad de hacer más específica la amplificación de los fragmentos.

Cuadro 8. Programa del termociclador para la reacción de RAPD-PCR.

Programa No.	Temperatura °C	Ciclos	Tiempo
23	94	1	1'
	94		30"
24	desnaturalización	38	
	40 alineamiento		30"
	72 extensión		1'30"
25	72 extensión	1	2'30"
10	4 enfriamiento	α	α

Los productos de amplificación se colocaron en un gel de agarosa al 1.2 %, preparada con TAE 1X (Trisbase P.M. 121.14, ácido acético glacial, EDTA 0.5M pH 8.0), se sometieron a electroforesis por 1.5 h a 78 volts. Al cabo de este tiempo se realizó una inmersión por 15-20 min en bromuro de etidio, se fotodocumentó y observó el perfil de bandas para definir los mejores iniciadores, para los fines de este trabajo.

5.7 Amplificación con la técnica RAPD

Básicamente se realizó el mismo procedimiento que para la selección de iniciadores (cuadro 7). Solo que las cantidades para cada una de las reacciones fue la siguiente (cuadro 9):

Cuadro 9. Concentración inicial, concentración final y volumen total de la mezcla de reacción para cada uno de los iniciadores seleccionados para la amplificación del DNA de 41 aislamientos.

	[] inicial	[] final	1X μ L	42X μ L
Agua bidestilada			4.45	186.90
dNTP's	500 μ M	200 μ M	10.0	420.00
Amortiguador	10X	1X	2.5	105.00
MgCl	50 mM	1.5 mM	0.75	31.50
Iniciadores ¹	10 pmol $\cdot\mu$ L ⁻¹	20 pmol	2.00	84.00
Taq-polimerasa	5 U $\cdot\mu$ L ⁻¹	2 U	0.300	12.60
DNA ²		100 ng $\cdot\mu$ L ⁻¹	5.00	
Total			25.00	840.00

¹ Para cada uno de los iniciadores se hizo una mezcla de reacción.

² El DNA se aplicó por separado al momento de distribuir la mezcla de reacción en cada uno de los 41 tubos para PCR.

5.8 Electroforesis de productos amplificados

Para separar los productos amplificados se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, cargando 10 μ L de los productos amplificados, mezclados con 2 μ L de amortiguador de carga 10X (Trisbase 50 mM pH 8.0, azul de bromofenol 2mg $\cdot$ mL⁻¹, cianal de xileno 2mg $\cdot$ mL⁻¹, glicerol 25%, EDTA 5mM pH 8 y ddH₂O) para cada pozo utilizado, en una cámara para electroforesis horizontal GIBCO BRL. El voltaje al que se corrió fue a 78 volts durante 2 h bajo con amortiguador de corrimiento TAE 1X; después se colocó el gel en una solución en bromuro de etidio 0.5 μ g $\cdot$ mL⁻¹ por 15-20 min. La fotodocumentación se realizó visualizando los productos de amplificación teñidos en un transiluminador exponiéndolo a la luz ultravioleta y se observó el

perfil de bandas, esperando que se observaran bandas bien definidas y sin barrido; para poder establecer los poliformismos a nivel de DNA genómico de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*. A los extremos de cada gel se colocaron a 3 μ L del marcador de peso molecular 10% (mezclado con amortiguador de carga) de GIBCO BRL Markers 1 KB DNA Ladder.

5.9 Análisis del perfil de bandas generado con RAPD

Cada uno de los geles documentados se analizó por separado con el programa Kodak Digital Science; asignando pesos moleculares a cada banda amplificada con base en las bandas del marcador de peso molecular; y de esta manera establecer de aislamientos que presentaron o no bandas comunes o polimórficas. De los datos generados de pesos moleculares se obtuvo una matriz de datos para codificar con el número 1 las bandas presentes y 0 para las bandas ausentes, así como con el número 9 para bandas poco nítidas.

5.10 Elaboración del dendrograma con RAPD

A partir de la matriz de datos se elaboró el dendrograma correspondiente basándose en los resultados obtenidos de los RAPD, se usó el Programa para Análisis Multivariado de Taxonomía Numérica (NTSYS-pc). Este programa elaboró a partir de la matriz de datos el coeficiente de similitud para generar una matriz de similitud utilizando el SMC mediante la opción SIMQUAL. El fenograma se obtuvo mediante el algoritmo jerárquico de pares de grupos (UPGMA) en la opción de agrupamiento SAHN.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Aislamiento e identificación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*

La recolecta de material vegetal fue dirigida a plantas con los síntomas de marchitez o amarillamiento (Figura 2 y 3), encontrándose que la distribución en campo es efectivamente en manchones (Figura 4); sin embargo se observó que los síntomas son favorecidos por el inadecuado manejo agronómico del cultivo, advirtiéndose que los suelos con mala preparación del terreno y manejo inapropiado del riego presentan casos muy dramáticos de infección de las plantas. Además se pudo apreciar en campo la presencia de los dos patotipos reportados para *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*. Al extraer las plantas del suelo, se observó un necrosamiento en la raíz, el sistema vascular obstruido y necrosado con coloraciones variables desde marrón a rojo – violáceo y en los daños de más tiempo, el sistema vascular se observó completamente de color negro, quizá por la presencia de saprofitos (Figura 5).

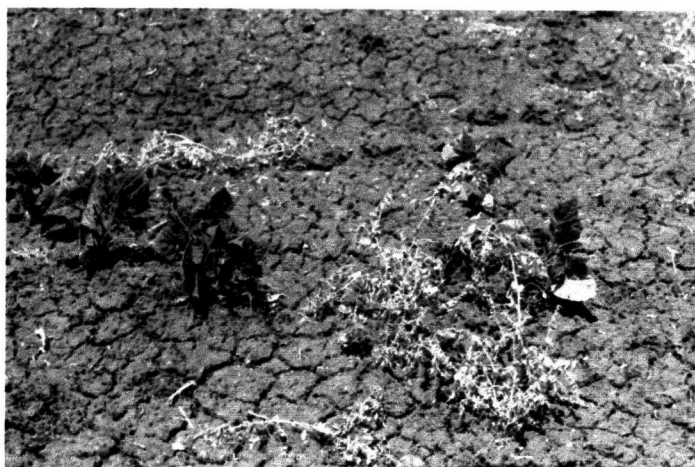


Figura 2. Síntomas de marchitez en garbanzo causados por *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*.



Figura 3. Síntomas de amarillamiento en garbanzo causados por *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*.



Figura 4. Distribución encontrada en campo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*.

Se obtuvieron un total de 97 aislamientos que correspondieron a *Fusarium* y otros hongos del complejo reportado en la literatura, los cuales no se estudiaron por no estar incluidos en el objetivo de este estudio. Del total de aislamientos, 79 corresponden al hongo fitopatógeno *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*; no obstante de todos los sitios muestreados se lograron obtener aislamientos del patógeno de interés.

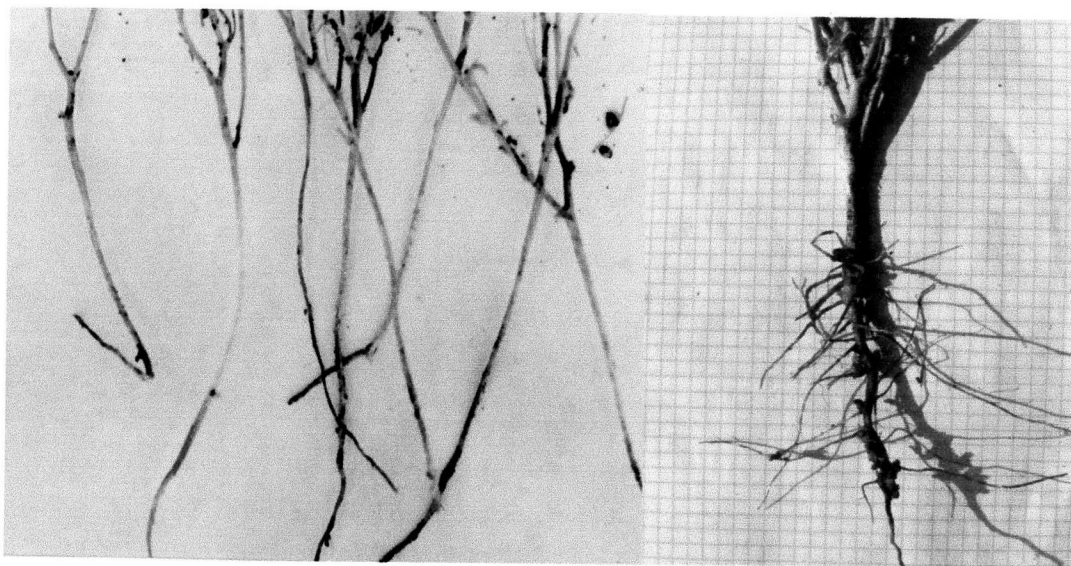


Figura 5. La figura muestra el sistema radical atrofiado y el sistema vascular necrosado.

Partridge (1991) establece que un mínimo de 20 aislamientos es suficiente para realizar estudios, en cambio la definición de un área geográfica de influencia es más problemática debido a que *Fusarium* es fácilmente diseminado por viento, agua, suelo, semilla y residuos de cosecha.

6.2 Extracción, cuantificación y calidad del DNA

Con el protocolo de extracción propuesto por Brainbridge *et al.*, 1990 y estandarizado por Cámara (2001), se encontró que la extracción mediante minipreps, partiendo de 0.1 g de micelio, se obtiene suficiente cantidad de DNA de buena calidad (Figura 6) y en concentraciones que variaron desde 0.345 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ a 3.371 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$; lo cual fue suficiente para los fines de este trabajo.

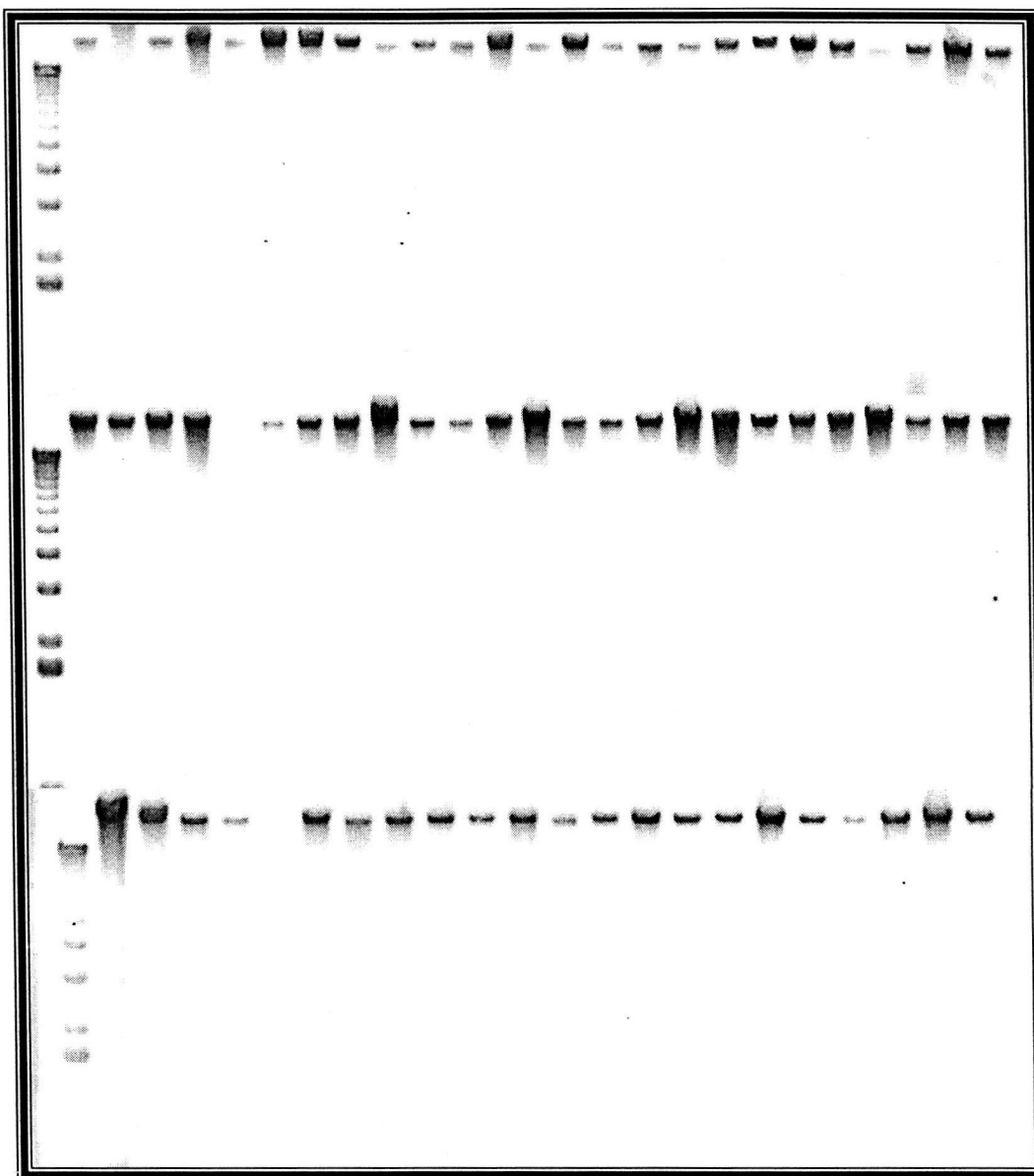


Figura 6. Perfil electroforético de la prueba de calidad del DNA de 73 aislamientos de *Fusarium oxysporum* obtenidos de plantas enfermas. Se muestra el DNA de alto peso molecular y el marcador de 1kb en el primer carril de cada panel.

6.3 Selección de iniciadores Carl Roth serie C

Los iniciadores seleccionados fueron Roth C-01 5' TTCGAGCCAG 3', Roth C-08 5' TGGACCGGTG 3', Roth C-11 5' AAAGCTGCGG 3', Roth C-14 5'

TGCGTCCTTG, Roth C-19 5' GTTGCCAGCC 3'. Se seleccionaron por amplificar fragmentos de DNA nítidos, con estos iniciadores el número de bandas amplificadas variaron de tres a ocho.

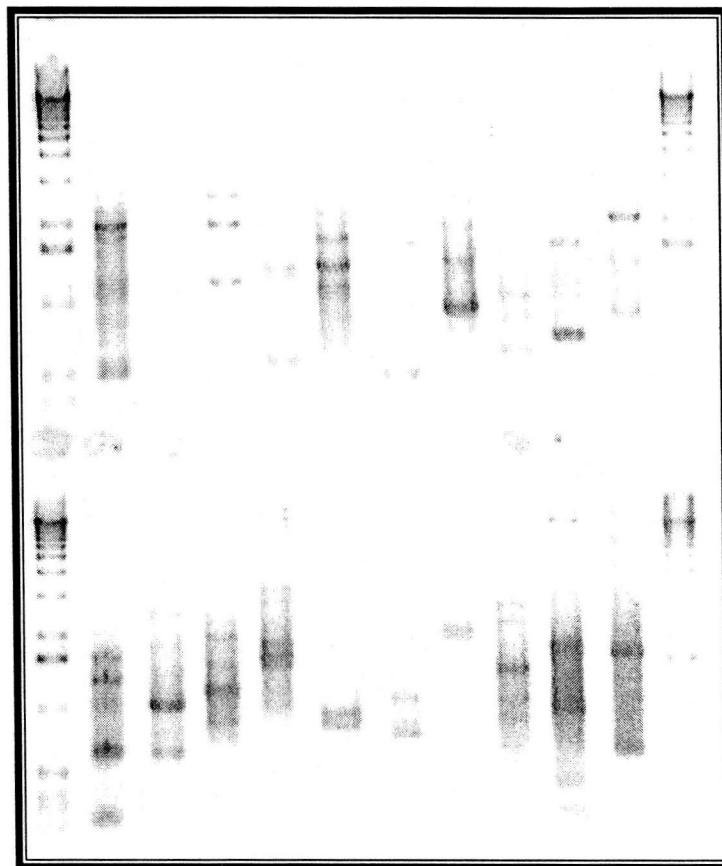


Figura 7. Productos de amplificación de los 20 iniciadores Roth que conforman la serie C con el DNA del aislamiento MS8. A los extremos se muestra el marcador de peso molecular de 1kb.

6.4 Productos de amplificación con la técnica RAPD

Las cantidades óptimas y concentraciones de las mezclas de reacción fueron las mencionadas en el cuadro 6 para cada uno de los iniciadores elegidos. Se pudieron observar los polimorfismos del DNA genómico generados con RAPD en cada uno de los perfiles electroforéticos.

6.5 Electroforesis de los productos de amplificación

En los perfiles electroforéticos obtenidos se pudo apreciar que la metodología utilizada permitió la separación de los productos de amplificación, observándose en algunos geles patrones bastante definidos (Figura 8 y 9); sin embargo, hubo otros en los que las bandas se aprecian bastante dilatadas, lo que pudo haberse debido a una sobretinción, con el bromuro de etidio, o por ser amplicones con pesos muy parecidos que no se separaron lo suficiente; además se observaron bandas poco visibles que pudieron haber sido resultado de amplicones con poca homología con las secuencias de los iniciadores utilizados en sus sitios de alineamiento y viceversa (Kelly *et al.*, 1994).

En otros casos no se obtuvieron huellas genómicas (figuras no mostradas) debido quizá a que los iniciadores utilizados no tuvieron complementariedad con el DNA de algunos aislamientos, descartando la degradación del DNA en las diluciones, ya que siempre fue una misma dilución para todas las reacciones de PCR y encontrándose que los aislamientos que no amplificaron con un iniciador, sí manifestaron huellas con otro iniciador diferente.

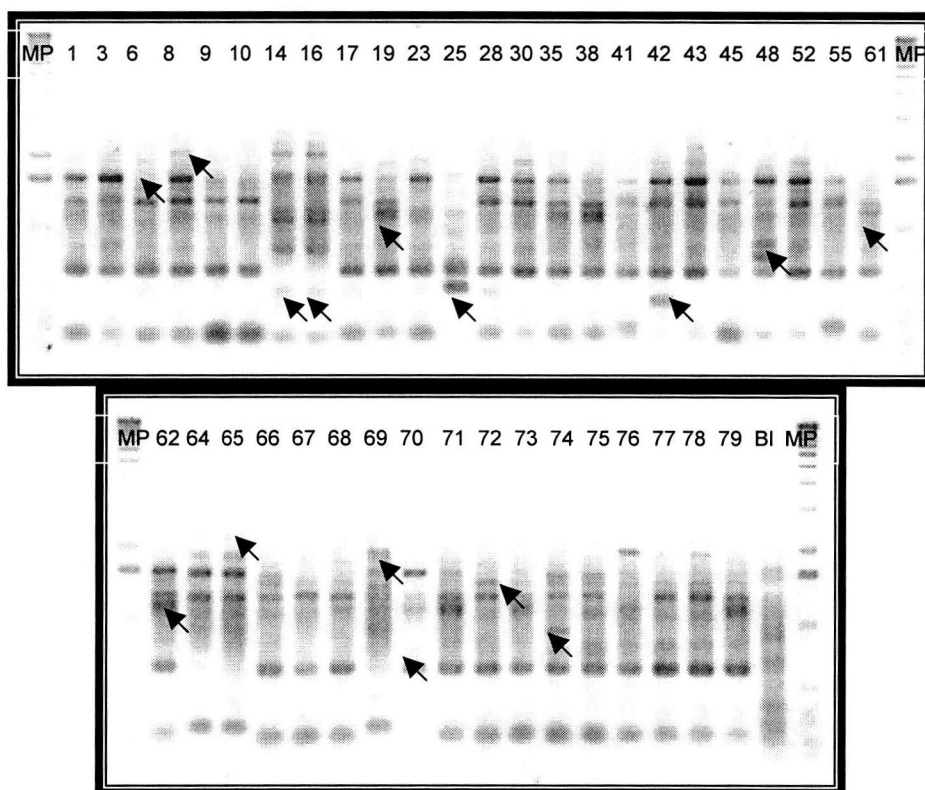


Figura 8. Perfiles electroforéticos (panel a y panel b) son los obtenidos con el iniciador Roth C-11 de los aislamientos enumerados en el cuadro 6 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. Las flechas señalan algunos polimorfismos encontrados. Mp se refiere al marcador de peso molecular 1kb utilizado.

Los iniciadores detectaron huellas genómicas en las que se pudieron apreciar polimorfismos con cada uno de ellos. Los polimorfismos detectados son el resultado de la ausencia o presencia de bandas comunes que establecen diferencia entre los distintos aislamientos. Los pesos moleculares de los fragmentos de DNA considerados en el análisis, fueron de alrededor de 2700 bp hasta 500 bp aproximadamente. Se observaron algunos polimorfismos muy claros en los que no se generaron bandas que fueron comunes para la mayoría de los aislamientos, como el caso de MM25, GVS45, MP14 y MP16, pero que a

su vez poseen bandas no comunes entre ellos excepto en MP14 y MP16 los cuales presentan prácticamente las mismas bandas (Figuras 8 y 9 paneles a).

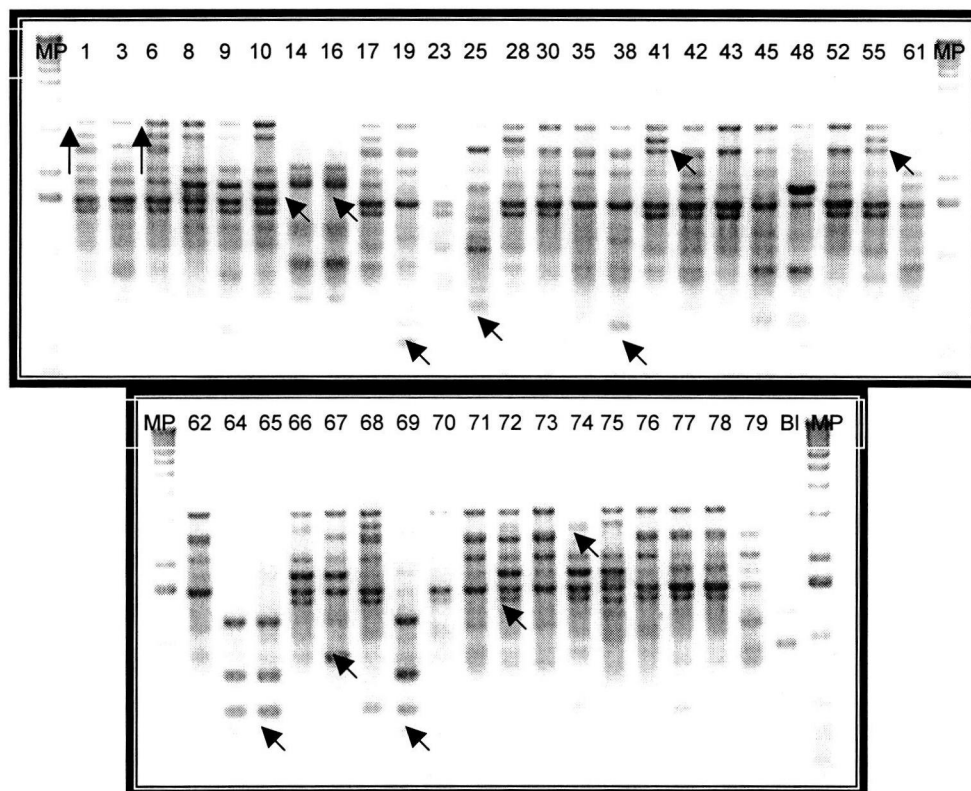


Figura 9. Perfiles electroforéticos (panel a y panel b) son obtenidos con el iniciador Roth C-14 de los aislamientos enumerados en el cuadro 6 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. Las flechas señalan algunos polimorfismos encontrados. Mp se refiere al marcador de peso molecular 1kb utilizado.

El iniciador C-08 generó mayor cantidad de polimorfismos comparado con el C-01, observándose claramente varios aislamientos con ausencia de bandas o con bandas de mayor o menor intensidad, pero compartidas por varios aislamientos, como el caso de MC1 y MS6, MS8, MS9 y MS10, GSa64 y GSa65, GYr77 y GYr78. Estos aislamientos mostraron un perfil electroforético similar tanto con el iniciador C-01 y C-08, o el caso de los aislamientos MP14 y

MP16 cuyas bandas compartidas son prácticamente iguales, como era de esperarse al provenir del mismo sitio de cultivo en ambos casos. Con este iniciador se generaron bandas con pesos alrededor de 2100 bp hasta 500 bp aproximadamente.

El comportamiento anterior persistió con el iniciador C-11, observándose polimorfismos resultado de ausencia o presencia de bandas; además del comportamiento en los aislamientos MC1 y MS6, MS8, MS9 y MS10, MP14 y MP16, GSa64 y GSa65 y GYr77 y GYr78, que coinciden con prácticamente en sus perfiles electroforéticos solo que con bandas de menor o mayor intensidad. Con este iniciador se generaron perfiles bastante definidos, con bandas delgadas que permiten establecer claramente los polimorfismos. Este iniciador generó bandas entre 3400-3200 bp y hasta de 500 bp.

En cambio el iniciador C-19, aunque mantuvo el mismo comportamiento generó menor cantidad de bandas y algunas de ellas bastante densas dificultando establecer si se trataba de 1 o 2 bandas. Con éste iniciador produjeron bandas desde 2500 bp hasta 500 bp aproximadamente.

Los aislamientos señalados se comportan de igual manera en el dendrograma generado a partir de la matriz de datos, observándose que se ubicaron cercanamente en los agrupamientos; e incluso, podrían considerarse como idénticos genéticamente al compartir su información genómica y agruparse con un coeficiente mayor al 90% o incluso de 100% caso de los aislamientos MP14

y MP16 (Figura 10). McAlpin *et al.*, (1998) consideraron en un solo grupo aquellos aislamientos con 80% de similitud en su trabajo sobre diversidad genética de *Aspergillus parasiticus*, mientras que los aislamientos con 100% de similitud en sus bandas, los consideraron como el mismo genotipo y posiblemente de la misma población clonal.

Cabe mencionar que en todos los perfiles electroforéticos se detectaron bandas que escapaban de los pesos moleculares considerados en el análisis. Las de pesos moleculares superiores, no se consideraron por tomar en cuenta que la DNA polimerasa que se utilizó no tiene normalmente la capacidad de amplificar fragmentos mayores a 5000 pb, además de que éstos no eran nítidos en muchos casos. En cambio los fragmentos de menor peso que no se consideraron fue por presentar una amplificación dudosa.

6.6 Análisis estadístico del dendrograma

Al observar el dendrograma (Figura 10), que indica el agrupamiento RAPD de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, se puede inferir una marcada variabilidad genética existente entre los aislamientos que se incluyeron en este estudio, lo cual previamente había sido considerada en los patrones electroforéticos obtenidos.

En el dendrograma los 41 aislamientos formaron diferentes grupos en función del coeficiente de similitud. Con un coeficiente de 0.50, fue posible separar dos grupos bastante diferentes entre sí (A y B). Es importante mencionar que éstos mostraron diferencias tanto morfológicas como electroforéticas y es posible que

el grupo B contenga aislamientos de géneros diferentes al *Fusarium*, tales como *F. roseum* o *F. solani*, los cuales también han sido reportados en la literatura como patógenos del garbanzo.

Con valores de similitud mayores el número de grupos se va incrementando en el dendrograma. Con un coeficiente de similitud de 0.60 se conforman 4 grupos (A, B, C y D) y con 0.70 los aislamientos formaron 7 grupos A, B, C, D, E, F y G). En este último (grupo grupo E) se ubican los aislamientos GSa64 y Gsa65 que se obtuvieron de plantas asintomáticas y sin embargo están agrupados en los agrupamientos que conforman a *F. oxysporum* f. sp. *cicieris*.

Por otro lado los aislamientos MP14 y MP16 (grupo F) se pueden considerar como un mismo individuo puesto que están agrupados con un coeficiente de similitud de 1.00 no encontrándose variación en sus genomas, sino al contrario, observándose una estrecha relación en sus huellas genómicas, lo cual se puede observar en los perfiles electroforéticos (Figuras 8 y 9).

Los aislamientos GCl66, GCl68, GYr78, GYr77, GJR73 y GRT79, evaluados anteriormente por Perales (2000) y Cámara (2001), se mantienen en un mismo agrupamiento (grupo A); sin embargo GCl67 que fue reportado en un grupo aparte por Cámara (2001) con un coeficiente de 0.35 de similitud, en este estudio resultó estar agrupado junto a los anteriores con un coeficiente de similitud de 0.70.

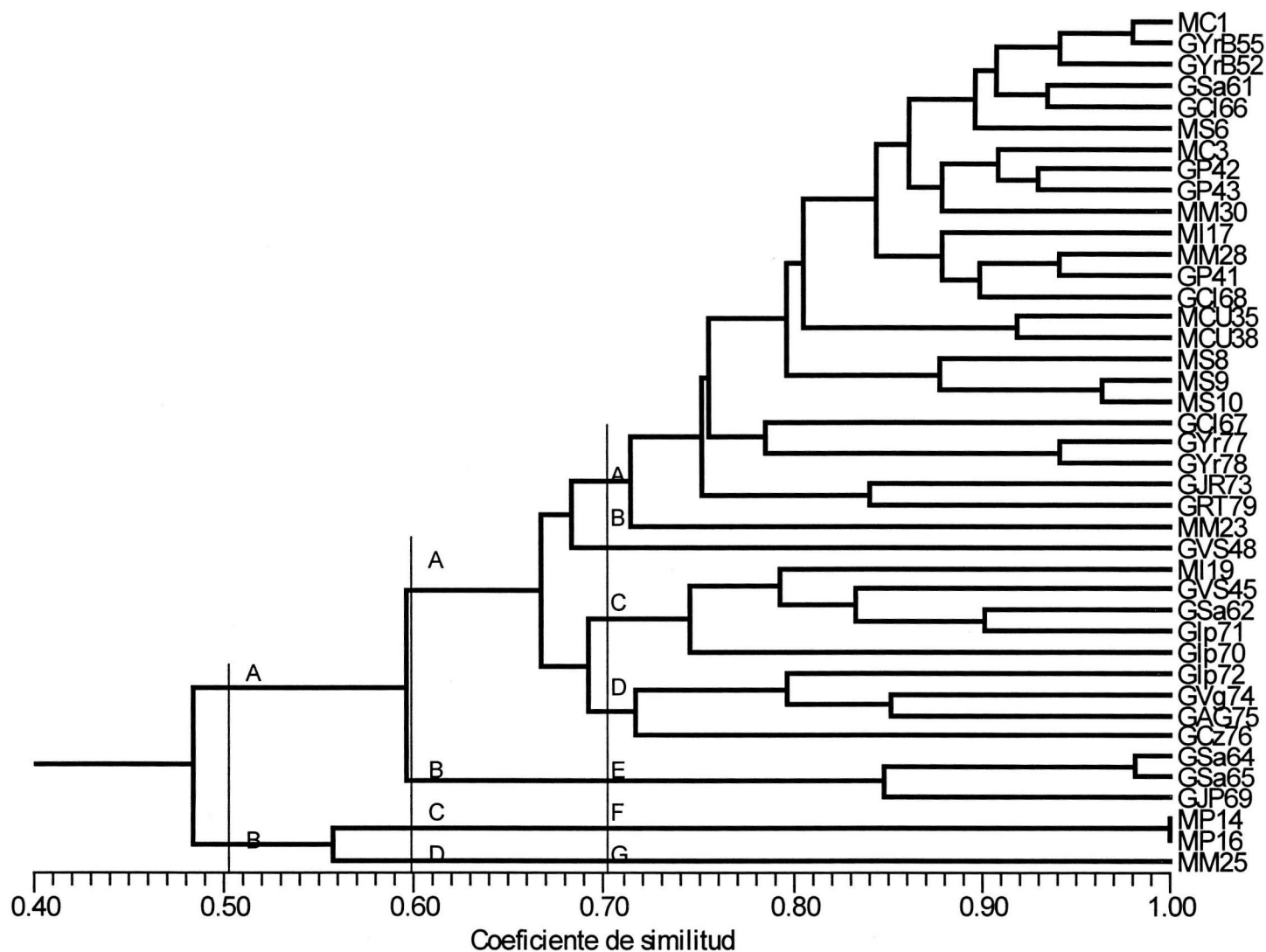


Figura 10. Agrupamiento de 41 aislamientos de *Fusarium oxysporum* aislado de plantas de garbanzo con marchitez o amarillamiento, analizados con 5 iniciadores RAPD y agrupados con el método UPGMA. Con un coeficiente de 0.50 se conforman 2 grupos (A y B); con 0.60 los aislamientos se forman 4 grupos (A, B, C y D) y con 0.70 se formaron 7 grupos (A, B, C, D, E, F y G)

En cambio los aislamientos GIp72, GVg74, GAG75, GCz76 también utilizados por Cámara (2001) se ubicaron en este trabajo en un grupo diferente (grupo D) con el mismo valor de similitud; mientras que GIp70 y GIp71 están ubicados en el grupo D, el GJP69 en el grupo E, en tanto que Cámara (2001) ubicó al GIp70, GIp71, GIp72, GVg74, GAG75, GCz76 en un mismo grupo y al GCI67 y GJP69 en otro. Estas diferencias encontradas en los mismos aislamientos, tienen varias explicaciones; en primer lugar Cámara (2001) utilizó en la técnica de RAPD temperaturas de alineamiento de 35° C, mientras que en el presente, la temperatura se incrementó a 40° C. Con este incremento se favoreció la amplificación de fragmentos más específicos, ya que a mayor temperatura de alineamiento mayor especificidad; por lo que la cantidad de artefactos que se pudieran haber obtenido con temperaturas inferiores a la utilizadas, lo cual ha sido un motivo de discusión continuo cuando se utiliza esta técnica de análisis.

Al considerar, en este trabajo un coeficiente de 0.85 se diferenciaron 22 grupos observándose el incremento de la individualidad; no obstante con valores de similitud mayores se individualiza cada aislamiento a excepción del MP14 y MP16 que se comportan como idénticos.

Estos resultados permiten suponer que la diferencia genómica entre las posibles razas presentes en los aislamientos colectados del Bajío, México y de acuerdo con nuestros resultados, no necesariamente es mayor de 0.85, bajo el supuesto de que en esta región se encuentra al menos una raza de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, lo cual se infiere por los síntomas observados en

campo (Figura 2 y 3) y por estudios previos al respecto, en los que se señala la posible existencia de las razas 1, 3 y 4 en esta región del Bajío (Pérez, 2000; Perales, 2000).

Se encontraron inclusive plantas asintomáticas de las cuales se pudo aislar el hongo *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, como en el caso de los aislamientos GSa64 y GSa65 aislados de plantas asintomáticas, pero que en el dendrograma están agrupados con un coeficiente de similitud de más de 0.90.

Perales (2000) reporta en su trabajo con patrones electroforéticos de proteínas, la existencia de tres grupos de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* con aislamientos de esa región, estableciendo que cada uno podría corresponder a una raza. En ese trabajo se ubicaron a los aislamientos GCl67, GAG75, GYr77 en la raza 1, los aislamientos GJR73, GCz76 los ubicó en la posible raza 3; y en lo que correspondería a la raza 4 ubicó a los aislamientos GCl66, Glp72, GVg74, los cuales también se utilizaron en este estudio. Contrastando con los resultados obtenidos con la metodología RAPD, en donde todos los aislamientos anteriores utilizados por Perales (2000) resultan asociados en dos grupos con un coeficiente de similitud de 0.70 encontrando además que los aislamientos GCl67, GYr77, GCl66 y GJR73 que corresponderían a la raza 1, 3 y a la 4; los últimos dos respectivamente, en el presente estudio se mantienen agrupados.

Algo similar sucede con los aislamientos GAG75, GCz76, Glp72 y GVg74, que corresponderían a las razas 1 (los dos primeros), a la raza 3 el Glp72 y a la raza

4 el último y , también se mantienen asociados en un mismo grupo en este estudio (Figura 10); lo cual pudo deberse a que la expresión de proteínas esta íntimamente ligada a la fisiología de los organismos y que además aunque se partió en ambos trabajos de un mismo aislamiento, para la obtención del DNA y proteínas se consideraron cultivos monospóricos diferentes lo cual vendría a comprobar una vez más la gran variabilidad de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*.

Además puede observarse que la variabilidad entre localidades y aún entre áreas de cultivo cercanas, como lo permiten ver los aislamientos GSa61 y GSa62 se presentan en dos grupos alejados a una distancia de 0.67, pese a que fueron recolectados en la misma parcela.

Finalmente se puede establecer que los aislamientos presentaron variabilidad en los perfiles electroforéticos y los agrupamientos conformados en el dendrograma, no obstante la cercanía de los sitios de procedencia.

Esta variabilidad también se observó entre los síntomas, reportándose los dos patotipos independientemente del lugar de donde proceden, puesto que en todas las zonas de recolecta se observaron plantas con amarillamiento y plantas con marchitez, además de zonas de cultivo donde se encontraron plantas asintomáticas, cuando menos en la parte aérea. Es decir que aún cuando en su dosel no presentaban síntomas, el sistema radical si se encontró afectado mostrando pocas raíces secundarias (Figura 5) y que al realizar cortes longitudinales y transversales tanto en raíz principal como en tallo, se observaron los síntomas reportados de coloraciones violáceas, aunado a la

obtención de aislamientos del patógeno a partir de esas plantas, lo cual permite suponer que se trata de aislamientos no patogénicos.

VII. CONCLUSIONES

El análisis RAPD con temperaturas de alineamiento superiores a 35° C permite detectar patrones electroforéticos más confiables y revelan eficazmente la variabilidad genética de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* existente en las áreas muestreadas de la zona de Bajío, México.

La técnica RAPD puede diferenciar a los aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, de aislamientos provenientes de plantas asintomáticas; así como de otros especies de *Fusarium*.

De los iniciadores elegidos el que amplificó mejor los polimorfismos en el DNA genómico de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* fueron el Roth C- 14 y Roth C-11, en ese orden.

Con los resultados obtenidos es posible establecer agrupamientos con un elevado coeficiente de similitud, pero no es posible diferenciar entre razas fisiológicas del hongo.

Los aislamientos que se obtuvieron de plantas con síntomas de amarillamiento, están más estrechamente relacionados.

VII. LITERATURA CITADA

- Agrios, G. N. 1996. Fitopatología. Editorial Limusa 2 ed. México. 838 pp.
- ASERCA. 1997. El garbanzo. Claridades Agropecuarias 42:1-44.
- Bainbridge, B. W., C. L.. Spreadbury, F. G. Scalise, and J. Cohen. 1990. Improved methods for the preparation of high molecular weight DNA from large and small scale cultures of filamentous fungi. Microbiology Letter. 66:113-118.
- Bhatti, M. A. 1992. Influence of soil bulk density on root rot and wilt of chickpea. Plant Disease 76:960-963
- Barve, M. P., Haware, M. P., Sainani, M. N., Ranjekar, P. K. and Gupta, V. S. 2001. Potential of microsatellites to distinguish four races *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* prevalent in India. Theoretical and Applied Genetics 102 (1): 138-147.
- Booth, C. 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey. England.
- Cámara M., A.. 2001. Diferenciación de aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* por RAPD's. Tesis de Maestría en Ciencias en Protección Vegetal. Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 54 pp
- Campos A. H. 1995. Marcadores Moleculares: Conceptos. AGRO SUR 23:68-75.

- Cepeda S., M. y L. Ayala C. 1984. Revisión Bibliográfica de las Enfermedades Causadas por *Fusarium* spp., en diferentes Cultivos. División de Agronomía, Departamento de Parasitología Agrícola, Área Fitopatología Agrícola. Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro". 30 pp.
- Conci, V. C., A. Vásquez and S. F. None. 1985. Study of the form of transmission of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* on chickpea (*Cicer arietinum* L). Fitopatología. 20:57–64 (Abst).
- Das, S. R. 1987. Control of chickpea wilt by fungicides. Pesticides 21: 9, 50-53 (Abst)
- De Miguel G., E. 1991. El garbanzo. Una alternativa para el secano. Ediciones Mundi – Prensa. Madrid, España.
- Edel, V., C. Steinberg, I. Avelange, G. Laguerre and C. Alabouvette. 1995. Comparison of three Molecular Methods for the Characterization of *Fusarium oxysporum* Strains. Phytopathology 85: 579-585
- FAO, 2001. Base de datos. <http://www.fao.org>
- Goel, S. R. and D. C. Gupta. 1986. Interaction of *Meloidogyne javanica* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* in chickpea. Indian Phytopathology 39:112-114 (Abst).
- Harjit-Singh., J. Kumar, J.B. Smithson and M. P. Haware. 1987. Complementation between genes for resistance to race 1 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* in chickpea. Plant Pathology 36: 539- 543 (Abst).
- INEGI. 2001. Información Digital. Carta Topográfica. Cobertura Nacional. Escala 1:1,000 000. Aguascalientes, México.

- INIA. 1979. Garbanzo para la costa de Hermosillo. SARH-CIANO. Hermosillo Sonora, México.
- Jiménez-Gasco, M. del M., E. Pérez-Artes, and R. M. Jiménez-Díaz, 2001. Identification of pathogenic races 0, 1B/C, 5, and 6 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* with random amplified polymorphic DNA (RAPD). European Journal of Plant Pathology 107: 237-248.
- Kaur, G., U. S. Sing, and G. K. Garg. 1987. Mode of action of toxin isolated from *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. Indian Phytopathology 40: 76-84 (Abst).
- Kelly, A., A. R. Alcalá-Jiménez, B. W. Bainbridge, J. B. Heale, E. Pérez-Artes, and R. M. Jiménez-Díaz. 1994. Use of genetic fingerprinting and random amplified polymorphic DNA to characterize pathotypes of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* infecting chickpea. Phytopathology 84:1293-1298.
- Kelly, A. G., B. W. Bainbridge., J. B. Heale, E. Pérez – Artes and R. M. Jiménez – Díaz. 1998. In planta–polymerase-chain-reaction detection of the wilt-inducing pathotype of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* in chickpea (*Cicer arietinum* L). Physiological and Molecular Plant Pathology 52: 397 - 409.
- Kumar, R., S. Ahmad, and S. Saxena. 1988. Disease complex in chickpea involving *Meloidogyna incognita* and *Fusarium oxysporum*. International Nematology Network Newsletter 5:12-14.
- Liddell, C.M. 1991. Recent Advances in *Fusarium* Systematics. Phytopathology 81:1044-1046.

- Mateos H., M. 1996. El cultivo del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en México. Tesis profesional. Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México.
- McAlpin, C. E., D. T. Wicklow, and C. E. Platis. 1998. Genotypic diversity of *Aspergillus parasiticus* in an Illinois corn field. Plant Disease 82:1132-1137.
- McDonald, J. G., E. Wong, and G. P. White. 2000. Differentiation of *Tilletia* species by rep-PCR genomic fingerprinting. Plant Disease 84:1121 – 1125.
- Mesquita, A. G. G., T. J. Paula, M. A. Moreira and E. G. de Barros. 1998. Identification of races of *Colletotrichum lindemuthianum* with the Aid of PCR- Based Molecular Markers. Plant Disease 82:1084-1087
- Microsoft. 2001. Enciclopedia Encarta 2001. Edición Básica. Microsoft Corporation. USA.
- Montero T., V. 2001. Marcadores genéticos moleculares. Seminario ABC de la biotecnología. INIFAP-CEVAMEX. México.
- Nelson, P.E., T.A. Tousson and W. F. O. Marassas. 1983. *Fusarium* species : An Illustrated Manual for Identification. The Pennsylvania State, University Press., University Park. London U.K. 193 pp.
- Om-Gupta, M. N. Khare, S. R. Kotasthane and O. Gupta. 1986. Variability among six isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* causing vascular wilt of chickpea. Indian Phytopathology 39: 279-281 (Abst).

- Partridge, J. E. 1991. Specific Gene Products of *Fusarium*: Analysis of Ribosomal Proteins. The American Phytopathological Society 81:1055-1058.
- Perales R., D. 2000. Identificación de razas fisiológicas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* mediante patrones electroforéticos de proteínas. Tesis Profesional. Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 42 pp
- Pérez – Artes, E. and M. Tena. 1989. Pectic enzymes from two races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. Enzyme production in culture and enzymatic activity on isolated chickpea cell walls. Journal of Phytopathology 124: 1-4, 39-51. (Abst).
- Pérez – Artes, E. and M. Tena. 1990. Purification and characterization of pectic enzymes from two races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* differing in virulence to chickpea (*Cicer arietinum* L). Physiological and Molecular Plant Pathology 37:107-124 (Abst).
- Pérez De la V., M. 1997. El uso de Marcadores Moleculares en Genética Vegetal y Mejora Investigación Agrícola para Production y Protection Vegetal 12: 33-60.
- Pérez G., O. 2000. Selección de líneas de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) resistentes a las razas fisiológicas 3 y 4 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* por RAPD's. Tesis de Maestría en Ciencias en Protección Vegetal. Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 54 pp.

- Rekah, Y., D. Shtienberg and J. Katan. 1999. Spatial Distribution and Temporal Development of *Fusarium* Crown and Root Rot of Tomato and Pathogen Dissemination in Field Soil. The American Phytopathological Society 89:831- 839.
- Romero C., S. 1993. Hongos fitopatógenos. Universidad Autónoma Chapingo. Dirección General del Patronato Universitario. Chapingo México. 347 pp.
- SIAP. 2002. Exportaciones agropecuarias, Enero-Diciembre 1999, Enero-Diciembre 2000 y Enero-Noviembre 2001. SAGARPA. México, D. F.
- Thakar, N. A., H. R. Patel, B. K. Patel, C. C. Patel. 1986. Breaking of resistance to *Fusarium* wilt in resistant chickpea by root-knot nematode. Madras Agricultural Journal. 73:410-411.
- Tekeoglu, M., Tullu, A., Kaiser, W. J., and Muehlbauer, F. J. 2000. Inheritance and linkage of two genes that confer resistance to *Fusarium* wilt in chickpea. Crop Science 40: 1247-1251.
- Tosa, Y. 1992. A model for the evaluation of formae speciales and races. Phytopathology 82:728-730
- Tullu, A., W. J. Kaiser, J. M. Kraft, and F. J. Muehlbauer. 1999. A second gene for resistance 4 of *Fusarium* wilt in chickpea and linkage with a RAPD marker. Euphytica 109:43-40.
- Updhyay, K. D., and B. K. Dwivedi, 1987. Root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* breaks wilt resistance in chickpea variety "Aurodhya". Current Science India 56 :915-916

- Vakalounakis, D. J. and G. A. Fragkiadakis. 1998. Genetic Diversity of *Fusarium oxysporum* Isolates from Cucumber: Differentiation by Pathogenicity, Vegetative Compatibility and RADP Fingerprinting. The American Phytopathological Society. 89:161-168.
- Valadez M., E. 2000. Estimación de la variabilidad genética de la colección de germoplasma del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) existente en México con técnicas moleculares. Tesis de Doctor en Ciencias en Biología. Facultad de Ciencias. UNAM. México D.F. 110 pp.
- Valadez M., E y G. Kahl. 2000. Huellas de DNA en Genomas de Plantas. (Teoría y protocolos de laboratorio). Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Mundi-Prensa México. D.F. México. 147 pp.
- Windels, E. C. 1991. current status of *Fusarium* taxonomy. Phytopathology 81:1048-1051

BIBLIOTECA CENTRAL U. A. CH

