

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA**

**DIFERENCIACIÓN DE AISLAMIENTOS DE
Fusarium graminearum Shw. POR
PATOGENICIDAD Y PCR.**



DIRECCION ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

T E S I S

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

**MAESTRO EN CIENCIAS EN
PROTECCIÓN VEGETAL**

PRESENTA:

Ma. LETICIA VIVAS ENRÍQUEZ



Chapingo, México, Diciembre del 2000

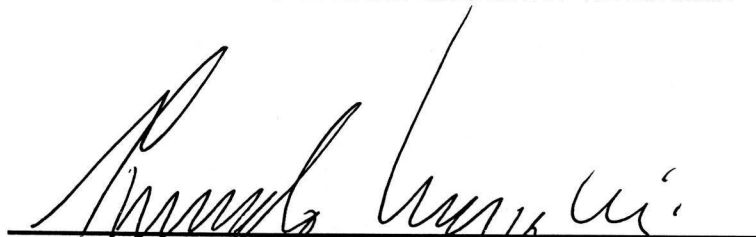
BIB. 94626

**DIFERENCIACIÓN DE AISLAMIENTOS DE *Fusarium graminearum* Shw. Petch
POR PATOGENICIDAD Y PCR.**

Tesis realizada por **Ma. LETICIA VIVAS ENRIQUEZ**, 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:



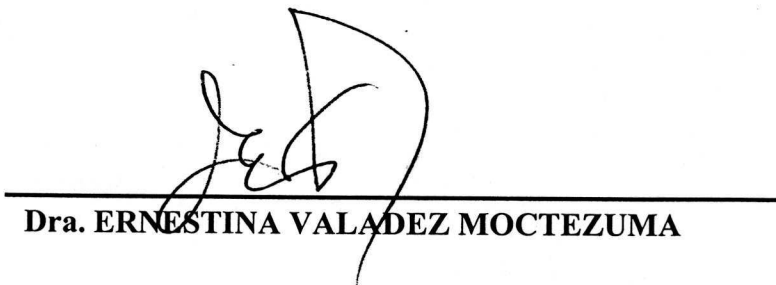
Dr. SANTOS GERARDO LEYVA MIR

Asesor:



Dr. HECTOR VILLASEÑOR MIR

Asesor:



Dra. ERNESTINA VALADEZ MOCTEZUMA

4.377/13

**DIFERENCIACIÓN DE AISLAMIENTOS DE *Fusarium graminearum* Shw. Petch
POR PATOGENICIDAD Y PCR.**

El jurado que revisó y aprobó el examen de grado de **Ma. Leticia Vivas Enriquez**, autora de la presente tesis de **Maestría en Ciencias en Protección Vegetal**, estuvo constituido por:

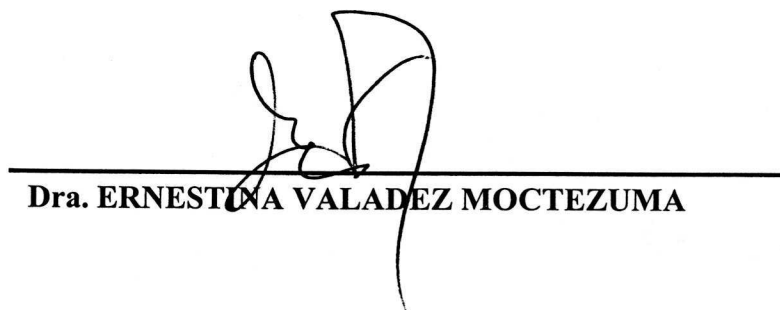
Presidente:


Dr. SANTOS GERARDO LEYVA MIR

Asesor:


Dr. HECTOR VILLASEÑOR MIR

Asesor:


Dra. ERNESTINA VALADEZ MOCTEZUMA

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Chapingo por haberme permitido realizar mis estudios de Maestría, y por el apoyo económico brindado para ello.

Al Dr. Gerardo Leyva Mir por la dirección de esta investigación, así como por el apoyo e interés que siempre mostró y por la gran disponibilidad y sencillez que lo caracterizan.

Al Dr. Héctor Villaseñor Mir por todas las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo, así como por formar parte de este comité asesor y por sus acertadas sugerencias.

A la Dra. Ernestina Valadez Moctezuma por su valiosa colaboración y disponibilidad para llevar a cabo este trabajo, así como por su excelente revisión y sugerencias para mejorar este escrito.

Al Dr. Nahum Marbán Mendoza por el apoyo y facilidades otorgadas en todo momento.

A los trabajadores del programa de trigo del CEVAMEX por el apoyo brindado para el establecimiento de este trabajo.

A María Elisa Alvarado y Ricardo Gaspar por su gran apoyo y ayuda en el Laboratorio de Biología Molecular.

A todos los profesores, que me impartieron sus conocimientos y ayudaron a mi formación.

A mis compañeros de Maestría con los cuales compartí esos momentos inolvidables de estudiante: Anselmo, Rocío, Angel, Alfonso, Joaquín, Gabino, Lilia, Higinio, Edwin.

A Noel Reyes Pérez por su amistad, ayuda y compañía durante esta etapa de mi vida, y por seguir siendo mi amigo.

A mi hermano Ignacio porque él logró en mí la inquietud e interés de realizar una Maestría, así como por su apoyo.

A mi madre por darme siempre ánimos y por apoyarme para terminar mis estudios.

A mis hermanos Anabel, Gustavo, Humberto por estar pendientes de mí y dispuestos a ayudarme a Miguel, Joaquín, Jorge, Roman, por que sigamos unidos.

A Jaime con quien conviví durante esta etapa de estudiante y de quien recibí amistad.

A ti Roberto por estar siempre cuando necesitaba un apoyo y por todos los años que hemos convivido juntos, pero sobre todo por esa gran amistad y cariño que hemos desarrollado.

Y a todas aquellas personas que de una u otra forma, fueron parte de esto

!!! GRACIAS !!!!

DEDICATORIA

**A MI MADRE, POR SER EL PILAR DE MI FAMILIA, UN
EJEMPLO DE LUCHA A SEGUIR, Y LA PERSONA A LA CUAL
MAS DEBO Y QUIERO.**

DATOS BIOGRÁFICOS

Ma. Leticia Vivas Enríquez nació en la Ciudad de Cardel, Veracruz el 25 de Febrero de 1974. Realizo sus estudios básicos en Atencingo, Pue. En 1989 ingresó a la Preparatoria Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo, en 1992 inició sus estudios de Licenciatura en Bermejillo, Dgo., de donde se graduó en 1996 como Ing. Agrónomo en Zonas Aridas. El 6 de diciembre del mismo año presentó su examen profesional con la tesis: Prácticas del cultivo de Sábila (*Aloe barbadensis* Miller) y algunos factores edafológicos que podrían influir sobre la calidad del gel. En Agosto de 1997 ingresó a la Maestría de Protección Vegetal del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo. Actualmente labora en el Departamento de Análisis de Riesgo del Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico Fitosanitario de Sanidad Vegetal.

RESUMEN

Con el objetivo de diferenciar aislamientos del agente causal de la roña del trigo (*Fusarium graminearum* Shw. Petch), de acuerdo al grado de patogenicidad en espigas inoculadas, así como por huellas de ADN detectadas por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), se evaluaron 10 aislamientos de *F. graminearum*, procedentes de los estados de México, Michoacán, Jalisco, Tlaxcala y Puebla. La inoculación se realizó a una concentración de 200,000 macroconidios por ml, en seis materiales de trigo, manteniendo las plantas 72 h a humedad relativa aproximada a 100%. La extracción de ADN de los aislamientos se realizó por la técnica propuesta por George *et al.* (1997), y fue amplificado por PCR utilizando iniciadores aleatorios. La prueba de Tukey, para el análisis de patogenicidad muestra traslape entre aislamientos, sin embargo el aislamiento procedente de Juchitepec se ubica como el aislamiento más patogénico y el de Tepatitlán como el menor. De acuerdo al Coeficiente de Similitud Genética estimado en el análisis de ADN, todos los aislamientos están relacionados, formando tres grupos; el primero formado por los aislamientos de Calpulalpan, Potzumarán y Tepatitlán; el segundo por Chapingo, Juchitepec, Metepec I y Jesús María; y el tercero por Bonilla y Metepec II. El aislamiento Cuyuaco no se ubica en agrupación alguna. Por lo anterior, se concluye que para poder diferenciar el grado de patogenicidad entre aislamientos de diferentes regiones geográficas por PCR es necesario utilizar un mayor número de aislamientos e iniciadores.

Palabras clave: *Fusarium graminearum*, patogenicidad, PCR, ADN, Coeficiente de Similitud Genética.

SUMMARY

With the objective to differentiate strains of the causal organism to the *Fusarium* head scab (*Fusarium graminearum* Shw. Petch), according with the pathogenic leave on the spikes inoculated, as well as for DNA marks detected by Polymerase Chain Reaction (PCR), were evaluated 10 strains of *F. graminearum*, from México state, Michoacan, Jalisco, Tlaxcala and Puebla. The inoculation was carry out to the next concentration of 200,000 macroconidias / ml, on six materials of wheat, the plants stayed 72 h to the relative moisture among to the 100%. The extraction of DNA to the strains was carried out for the technique proposal by George *et. al.* (1997), and was amplify in PCR, to used randoms primers. The Tukey test for the pathogenic analysis showed overlap between strains, however the strains from Juchitepec town was considered the more pathogenic strain, and the Tepatitlán town strain was the minor pathogenic. According with the Genetic Similar Coefficient to estimate on the ADN analysis, all the strains are related, to formed three groups, the first is integrated for the Calpulalpán, Potzumarán, y Tepatitlán strains, the second group are Chapingo, Juchitepec, Metepec I and Jesús María; and the last Metepec II and Bonilla. The strain Cuyuaco wasn't located in some group. Due to the previous, we conclude that if want differences the pathogenic leave between strains from different geography's regions by PCR, is necessary to use a larger number of the strains and primers.

Key words: *Fusarium graminearum*, pathogenic, PCR, DNA, Genetic Similar Coefficient.

CONTENIDO	Pag.
RESUMEN.....	vii
SUMMARY.....	viii
ÍNDICE DE CUADROS.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	6
2.1. Morfología y fisiología de <i>Fusarium graminearum</i>	6
2.2. Hospederos.....	7
2.3. Epidemiología.....	7
2.3.1. Sobrevivencia.....	7
2.3.2. Diseminación de inóculo.....	8
2.3.3. Condiciones ambientales.....	8
2.3.4. Infección y colonización de espigas.....	9
2.3.5. Sintomatología.....	10
2.4. Daños.....	11
2.4.1. Contaminación por toxinas.....	11
2.5. Control.....	14
2.6. Especialización patogénica.....	17
2.7. Especialización fisiológica.....	18
2.8. Utilización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en <i>Fusarium</i>	21

3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
3.1. Colecta de semillas.....	26
3.2. Aislamiento e identificación de <i>F. graminearum</i>	26
3.3. Aislamientos monoconidiales.....	26
3.4. Producción de inóculo.....	27
3.5. Hospedero.....	28
3.6. Inoculación.....	28
3.7. Evaluación.....	29
3.8. Análisis de datos.....	29
3.9. Extracción de ADN de <i>F. graminearum</i>	29
3.10. Cuantificación de ADN.....	31
3.11. Estandarización de los componentes de la Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	31
3.12. Amplificación de ADN de aislamientos de <i>F. graminearum</i>	33
3.13. Evaluación.....	33
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
4.1. Aislamientos de <i>F. graminearum</i>	34
4.2. Inoculación de espigas.....	34
4.3. Detección de huellas genómicas de ADN de <i>F. graminearum</i>	38
4.4. Dendograma de los aislamientos de <i>F. graminearum</i>	42
5. CONCLUSIONES.....	45
6. LITERATURA CITADA.....	47

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1. Escala de evaluación para el tizón o roña de la espiga del trigo <i>F. graminearum</i>	29
CUADRO 2. Programa de amplificación de RAPD's	32
CUADRO 3. Agrupación de medias Tukey de acuerdo al nivel de resistencia de las variedades inoculadas con <i>F. graminearum</i>	34
CUADRO 4. Porcentaje de área foliar dañada bajo condiciones de campo por el complejo de enfermedades foliares en genotipos de trigo, verano de 1999.	36
CUADRO 5. Agrupación de medias Tukey al 5% de acuerdo al grado de virulencia de los 10 aislamientos de <i>F. graminearum</i>	37

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Aislamiento A9 de <i>F. graminearum</i>	35
FIGURA 2. Aislamiento A2 de <i>F. graminearum</i>	35
FIGURA 3. Genotipo Gálvez inoculado con el aislamiento A1.....	35
FIGURA 4. Genotipo Chil / Chun 18 inoculado con el aislamiento A1.....	35
FIGURA 5. Patrones de ADN detectados con RADP's con los iniciadores ROTH C-01 (izquierdo) y ROTH C-06 (derecho) de los aislamientos A9, A7, A1, A8, A10, A6, A4, A5, A3, A2 y G (ADN de garbanzo) y marcador de peso molecular de 1 kb.....	39
FIGURA 6. Patrones de ADN detectados con RADP's con los iniciadores ROTH C-12 (izquierdo) y ROTH C-13 (derecho) de los aislamientos A9, A7, A1, A8, A10, A6, A4, A5, A3, A2 y G (ADN de garbanzo) y marcador de peso molecular de 1 kb.....	40
FIGURA 7. Patrones de ADN detectados con RADP's con los iniciadores ROTH C-15 (izquierdo) y ROTH C-16 (derecho) de los aislamientos A9, A7, A1, A8, A10, A6, A4, A5, A3, A2 y G (ADN de garbanzo) y marcador de peso molecular de 1 kb.....	40
FIGURA 8. Patrones de ADN detectados con RADP's con el iniciador ROTH C-20 de los aislamientos A9, A7, A1, A8, A10, A6, A4, A5, A3, A2 y G (ADN de garbanzo) y marcador de peso molecular.....	41
FIGURA 9. Agrupación de aislamientos de <i>F. graminearum</i> de acuerdo a la similaridad de las bandas amplificadas entre aislamientos.....	42

1. INTRODUCCIÓN

Fusarium graminearum Schwabe (estado sexual *Gibberella zeae* Shw., Petch) es el agente causal de la roña, tizón de la espiga de trigo o fusariosis. De acuerdo con Parry *et al.* (1995) los primeros reportes de esta enfermedad se hicieron en Inglaterra en 1884 por Smith, quien la atribuye a *Fusisporum culmorum*. En los Estados Unidos, fue reportada en 1890 por Chester, en 1891 por Artur y en 1892 por Detmers quien también atribuye la enfermedad a *F. culmorum* (Parry *et al.*, 1995). En Japón fue observada en 1902 (Ireta y Gilchrist, 1994). En la década de los veinte, diversos autores como Johnson, Fogelman y Koehler, identificaron por primera vez como principal agente causal de la roña de la espiga a *F. graminearum* en los cultivos de trigo de Estados Unidos (Parry *et al.*, 1995). En México esta enfermedad se observó en 1977 en el área del Altiplano de Jalisco, aunque en esa ocasión no se precisó la especie del patógeno responsable (Huerta, citado por Ireta y Gilchrist, 1994).

En la actualidad, la roña o tizón de la espiga se presenta en las regiones cálidas húmedas del mundo, como el Norte-Centro de Europa y Asia; principalmente en China y Japón, donde se menciona como endémica (Arthur, citado por Ireta y Gilchrist, 1994; McMullen *et al.*, 1997). Se tienen reportes de su presencia en la zona costera del Norte de África, Norte de Estados Unidos y Sur de Canadá, así como la parte Sur del Continente americano (Arthur, citado por Ireta y Gilchrist, 1994). En México esta enfermedad se encuentra con mayor incidencia en áreas de temporal en los estados de Jalisco, Michoacán, México, Tlaxcala e Hidalgo; también se ha

observado en trigo de riego durante el verano en la zona del Bajío en Guanajuato (Ireta y Gilchrist, 1994).

La roña o tizón de la espiga del trigo ha causado serios daños económicos en su producción. En el Valle del Yangtze China en una epidemia de dos años en los 30's, causó pérdidas del 40%, y cada año en este lugar afecta alrededor de siete millones de hectáreas y en uno de cada cinco años las pérdidas alcanzan el 50%. En el período de 1951 a 1985 el promedio de frecuencia de epifitias de la roña fue de 54.2%, la incidencia fue de 50 a 100% y la producción se redujo en un 5 a 15% (Chaofei, citado por Ireta y Gilchrist, 1994). En Japón se han reportado pérdidas hasta del 50% (Galich, 1989). En Rumania se reportaron pérdidas en 1972 y 1981 de 70 y 40% respectivamente y en Hungría hubo pérdidas de 40 a 50% en 1970 (Kükedi, citado por Parry *et al.*, 1995). En Argentina han ocurrido epidemias en los años 60's, 70's y 80's (McMullen *et al.*, 1997). Durante 1978 las pérdidas en este país se estimaron en 30% en el Este de las provincias de Santa Fe y Córdoba, mientras que en el Oeste de la misma región se estimaron en 10%; en 1985 las pérdidas en las áreas Centro Oeste, Centro Este y Centro Sur fueron de 9.3, 13.3 y 5.4%, respectivamente (Galich, 1989).

En Estados Unidos la roña de la espiga fue encontrada en 31 de 40 estados muestreados en 1917 y se estimó una pérdida de 288,000 toneladas, siendo más afectados los estados Ohio, Indiana e Illinois; en 1919 las pérdidas fueron de 2.18 millones de toneladas, mientras que en 1980 se dio una epidemia en los estados de Kansas, Nebraska, Missouri, Oklahoma, Iowa, Indiana y New York; en 1982 ocasionó una reducción en la producción total de trigo de 2.72 millones de toneladas

siendo esto un 4% del total de la producción de este país, y para 1996 se tuvieron pérdidas en once estados, afectando 6.1 millones de hectáreas de las 29.1 millones que fueron sembradas, dando como resultado casi un 25% del total (McMullen *et al.*, 1997).

En las regiones productoras de trigo de temporal en México, como en la Sierra Tarasca en Michoacán, la región de los Altos de Jalisco, Sierra del Tigre y Tapalpa, así como en el Valle de Toluca y la región de Jicotepec, estado de México, la presencia de la roña de la espiga es alta; también en los Valles Altos de Tlaxcala e Hidalgo tiene una presencia importante. Su incidencia se ha incrementado en los últimos años debido a que en estas regiones se practica la rotación maíz- trigo, y este hongo ataca a los dos hospedantes, presentando incidencias hasta del 60% a nivel poblacional y del 10 a 15% a nivel individual o de espiga. Esto constituye un daño moderado en el rendimiento, aunque cuando se presenta en variedades susceptibles, puede disminuir la producción comercial hasta en un 17% (Ireta, 1986; Ireta y Gilchrist, 1994).

En México se cultivan 227 299 hectáreas de trigo en condiciones de temporal (SAGAR, 1997). En estas siembras la roña o tizón de la espiga *F. graminearum* es una enfermedad importante, sobre todo en lugares donde se tiene humedad relativa continua, y un rango de temperatura de 25 a 30°C (SARH, 1992; McMullen *et al.*, 1997).

La mejor opción de control para *F. graminearum* es el uso de variedades resistentes de trigo de temporal (SARH, 1992; Ireta y Gilchrist, 1994; Parry *et al.*, 1995; McMullen *et al.*, 1997). Se han detectado genotipos de trigo con buen grado de

resistencia, principalmente los trigos suaves; sin embargo, la versatilidad de comportamiento de *F. graminearum* a dificultado su control (Ireta y Gilchrist, 1994). El mantener la resistencia de la mayoría de los trigos comerciales, sería a expensas del rendimiento y calidad (McMullen *et al.*, 1997). Diversos autores de diferentes partes del mundo como Miller en 1985 de Canada, Hanson en 1950, Bai *et al.* en 1989, Wilcoxson en 1992 de Estados Unidos, Saur en 1991 de Francia, Mielke en 1980, Miedaner y Walther en 1987 de Alemania, Tomasovic en 1989 de Yugoslavia, Liu y Wang en 1991 de China y Brahma en 1988 de la India, concluyen que no hay cultivares de trigo inmunes a *F. graminearum* la gran mayoría son susceptibles y unos pocos son moderadamente resistentes (Parry *et al.*, 1995).

En 1984 cuando Mesterhazy inoculó espigas de trigo de dos genotipos con aislamientos de *F. graminearum* encontró que la diferencia entre la patogenicidad de los aislamientos se debía a la resistencia que presentaba cada uno de los genotipos. Otros autores reportan que la variación en la patogenicidad puede ser atribuida a la edad y condición del aislamiento, más que a la determinación genética del patógeno (Parry *et al.*, 1995).

Estudios recientes en la búsqueda de fuentes de resistencia a la roña o tizón de la espiga involucran técnicas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para identificar individuos genéticamente resistentes basados en Marcadores Moleculares de PCR (Gilbert *et al.*, 1996). Sin embargo, también se ha utilizado PCR en la detección y cuantificación de especies de *Fusarium* (Nicholson *et al.*, 1996), más no así para la identificación de razas fisiológicas en *F. graminearum* sobre todo, cuando no se cuenta con plantas diferenciales de trigo para la identificación de razas fisiológicas de este hongo.

En México uno de los estudios más recientes en variación genética de hongos fitopatógenos donde se involucran técnicas moleculares como polimorfismo en fragmentos de restricción del ADN (RFLP's), fue realizado por Leyva (1998) en *Septoria tritici*, donde se evidencia una vez más la variación fisiológica entre aislamientos. Con este antecedente y ya que en México no se tienen estudios anteriores de la diferenciación de aislamientos de *F. graminearum* con alguna técnica molecular, se establecieron los siguientes objetivos:

- 1) Observar el comportamiento de seis genotipos de trigo de temporal tolerantes y susceptibles, inoculado con diferentes aislamientos de *F. graminearum*
- 2) Diferenciar aislamientos de *F. graminearum* de acuerdo al nivel de virulencia en trigo
- 3) Definir los protocolos para la extracción de ADN de *F. graminearum* y la técnica de RAPD's para futuros trabajos.
- 4) Diferenciar aislamientos de *F. graminearum* por medio de RAPD's - PCR

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Morfología y fisiología de *F. graminearum*

F. graminearum presenta fiálides laterales cortos de 3.5μ X 10μ a 14μ y macroconidios en forma de canoa de 2.5μ - 5μ - 6μ con 3 a 7 septas. Una característica distintiva de los macroconidios de este hongo es la célula basal en forma de pie; esta especie no produce microconidios. La producción de macroconidios en medio de cultivo se realiza sobre fiálides simples, que pueden o no estar sobre conidióforos ramificados o agrupados formando un esporodoquio. Produce abundante micelio aéreo que se torna rosa hasta rojo intenso o púrpura cuando hace contacto con el agar (Ireta y Gilchrist, 1994).

Fusarium produce esporas sexuales e inverna en el suelo o restos de plantas en forma de micelio; las esporas asexuales de pared gruesa son denominadas clamidosporas (Agrios, 1985). La formación de clamidosporas se puede observar en forma intercalada o terminal en el micelio o en los macroconidios; las clamidosporas son de forma globosa, llegando a medir de 10μ a 12μ de diámetro (Ireta y Gilchrist, 1994).

F. graminearum es de las pocas especies que produce peritecios en condiciones de campo. Los peritecios representan la fase sexual del hongo (*Gibberella zeae*) y se les observa sobre las glumas del trigo, emergiendo del tejido de éste. Dichos peritecios juegan un papel importante en la supervivencia del patógeno de un año a otro, ya que junto con el micelio que permanece sobre los restos del cultivo anterior, representan la

fuelle de inóculo inicial de la fusariosis; los peritecios son de color púrpura a negro y se forman a partir de un estroma inconspicuo o ligero; son de forma ovoide, papilada, con un diámetro de 150μ a 350μ . Cada peritecio posee ocho ascas distribuidas en su interior, las ascas son de forma clavada y llegan a medir 8μ a 11μ X 60μ a 85μ . De igual forma, cada asca posee en su interior ocho ascosporas que miden de 3μ a 5μ X 17μ a 25μ y presentan de una a cuatro septas. Las ascosporas son de color subhialino a ligeramente amarillo-café, con las puntas redondeadas (Ireta y Gilchrist, 1994).

2.2. Hospederos

Los hospederos más comunes de *F. graminearum*, además del trigo, son la cebada, la avena, el centeno, el maíz, la alfalfa y el triticale (Ireta y Gilchrist, 1994). También se han reportado gramíneas silvestres como *Brachiaria plantaginea* (L.K.) Hitch, *Pennisetum purpureum* Chumach, *P. clandestinum* Chiov., *Digitaria sanguinalis* (L.) Scap, *Paspalum* spp., *Andropogon bicornis* L. y *Eryathus* sp., como hospederos secundarios o sustratos saprofíticos (Ries, 1989).

2.3. Epidemiología

2.3.1. Sobrevivencia

El inóculo sobrevive como micelio o clamidosporas de forma saprófita en el suelo y es considerado como el principal reservorio (Parry *et al.* , 1995). Otra fuente importante de inóculo son los granos de trigo infectados que quedan en el suelo después de la cosecha, ya que debido a su bajo peso, los granos son arrojados junto con la paja de trigo, donde permanecen hasta el siguiente ciclo (Ireta y Gilchrist, 1994). En el caso de

Gibberella zeae la fuente principal de inóculo son las ascosporas producidas en el interior de los peritecios (Ireta y Gilchrist, 1994; Parry *et al.*, 1995).

2.3.2. Diseminación de inóculo

La lluvia es un importante medio de dispersión, así como el agua de riego y el viento (Parry *et al.*, 1995). La mayoría de las semillas infectadas son eliminadas por la trilladora y caen al suelo, donde se mantienen en la superficie y son fuente de inóculo para el cultivo del año siguiente (Ireta y Gilchrist, 1994). Los conidios no son adaptados a la diseminación anemófila por estar embebidos en una sustancia gelatinosa que los protege de la desecación, y que sólo es disuelta por el agua. Por lo tanto, este tipo de inóculo es diseminado por la salpicadura de la lluvia y consecuentemente a corta distancia. Contrariamente, las ascosporas contenidas en los peritecios requieren agua para ser lanzadas al aire y transportadas por el viento en todas direcciones (Ries, 1989). Windel, citado por Parry *et al.* (1995) reporta que el escarabajo *Glischrochilus quadrisignatus* podría ser un insecto muy importante en la diseminación de inóculo de *Fusarium*.

2.3.3. Condiciones ambientales

Las condiciones apropiadas para la producción del inóculo son humedad relativa elevada y una temperatura ligeramente caliente (McMullen *et al.*, 1997). Cook y Christen, citados por Parry *et al.* (1995), reportan que *F. graminearum* tiene un crecimiento óptimo entre 20 y 30 °C; por otra parte Miller y Trenholm (1994), mencionan que se desarrolla mejor en áreas húmedas y con temperaturas de 30 °C. La temperatura requerida para la formación de macroconidios es de 16 a 36 °C, con un

óptimo de 32 °C. La formación de peritecios en campo se observa de cuatro a cinco semanas después de las primeras infecciones, siempre y cuando las condiciones ambientales se mantengan favorables. Se ha observado que las ascosporas se pueden producir con temperaturas de 13 a 33 °C, con un óptimo de 25 a 28 °C (Reis, 1989; Ireta y Gilchrist, 1994). La luz ultravioleta es un factor importante en la formación de peritecios (Reis, 1989). Bajo condiciones de las Sierras de Jalisco y de Michoacán se ha observado que la humedad relativa alta es más determinante que la temperatura alta para la producción de los síntomas del tizón de la espiga (Ireta y Gilchrist, 1994).

2.3.4. Infección y colonización de espigas

El inóculo al ser diseminado por el viento es depositado sobre las anteras de trigo que salen de la flor después de la antesis, se trata de una infección floral (Ries, 1989; Ireta y Gilchrist, 1994). Las primeras infecciones se pueden iniciar indistintamente a partir de ascosporas o macroconidios (Ireta y Gilchrist, 1994). Una vez sobre las anteras, con humedad relativa alta y temperatura de 25 a 28 °C, las esporas germinan y penetran rápidamente en la flor de trigo usando los filamentos como vehículo para pasar del exterior al interior de la flor (Ries, 1989). La infección ocurre después de 24 h de humedad relativa del 100% y temperatura de 25 °C (Parry *et al.*, 1995). Ireta y Gilchrist (1994) reportan que una temperatura de 10 a 30° C y humedad relativa mayor de 95% durante 40 a 60 h son suficientes para que la infección con macroconidios en las espigas tenga éxito; sin embargo, en el Valle de Toluca en el estado de México, los síntomas sólo se pueden observar hasta después de 72 h de la inoculación.

Se ha indicado que el hongo necesita de las anteras como base saprófita para poder penetrar en la flor, debido a que *F. graminearum* es saprófita facultativo y parásito bajo

ciertas condiciones (Ireta y Gilchrist, 1994). El período de susceptibilidad del trigo es principalmente durante la floración, por lo tanto si no hay anteras expuestas, el hongo difícilmente llegará al interior de la flor (Ries, 1989). En caso de que aún no hayan salido las anteras, las esporas pueden permanecer viables por algunos días en espera de las anteras, para posteriormente iniciar el proceso de penetración (Ireta, 1986). También existe evidencia preliminar de que los conidios, una vez que han germinado, pueden penetrar directamente a través de las glumas (Ireta, 1986; Parry *et al.*, 1995).

La presencia del patógeno sobre la flor de trigo incrementa la concentración de glucosa y fructuosa en las glumas, sin embargo el efecto de estas sustancias sobre *F. graminearum* no ha sido aclarado (Parry *et al.*, 1995). Strange, citado por Parry *et al.* (1995) reporta que la betaína y colina, estimulan el desarrollo del patógeno. Dichas sustancias se encuentran en forma normal en la planta, principalmente en las anteras y en el ovario de la flor, pero bajo las infecciones de *F. graminearum* aumentan su concentración, lo que determina la especificidad del hongo para los órganos florales del trigo (Ries, 1989; Ireta y Gilchrist, 1994).

2.3.5. Sintomatología

La infección inicial aparece como una pequeña mancha oscura en las glumas de las espiguillas del tercio medio de la espiga o sobre el raquis (Parry *et al.*, 1995). La espiguilla infectada pierde clorofila rápidamente y se torna descolorida. Posteriormente el crecimiento del micelio del hongo sobre las bandas y base de las glumas le da un aspecto algodonoso de color rosa salmón a rojo. Si la severidad del ataque es moderado, los granos pueden quedar chupados y bajos de peso, además de tomar una coloración blanquecina (Parry *et al.*, 1995).

La formación de peritecios es asociada con *Gibberella zeae* y se puede observar cuando el cultivo en general ha llegado o está próximo a la madurez. Es entonces cuando sobre las espiguillas enfermas aparecen manchas de peritecios de color negro que parecen emerger de los tejidos infectados (Ireta y Gilchrist, 1994; Parry *et al.*, 1995).

En las localidades de México donde se presenta la enfermedad en las siembras de trigo de temporal, sólo se han observado peritecios en el trigo cultivado en la Sierra del Tigre y en los Altos de Jalisco (Ireta y Gilchrist, 1994).

2.4. Daños

Los daños más intensos están relacionados con la muerte de las plántulas, la reducción del rendimiento debido al aborto de las flores o la producción de granos huecos o chupados, variando en intensidad según las condiciones climáticas del año o de las regiones sembradas.

En el Valle del Yangtze en China ocasiona pérdidas en uno de cada cinco años del 50% (Chaoferi, citado por Ireta y Gilchrist, 1994). Los efectos en la calidad del grano son la reducción de proteína bajando la calidad de harina, además del riesgo de las micotoxinas, en donde la toxina más comúnmente asociada con la infección de *F. graminearum* es deoxynivalenol y zearalenona (Mesterhazy, 1996; Piñeiro, 1996; McMullen *et al.*, 1997).

2.4.1. Contaminación por toxinas

El término micotoxina se refiere a metabolitos fúngicos que son tóxicos para los animales, incluyendo al hombre. Afectan de diferentes maneras, causando desde pérdidas de peso, temblores musculares y pérdida de la coordinación muscular, hasta

cáncer y muerte del animal; son efectivos en cantidades muy pequeñas (Ulloa y Hanlin, 1978). Las micotoxinas se incluyen en el grupo de los tricotecenos. El género *Fusarium* es uno de los más prolíficos en la producción de micotoxinas, especialmente cuando ataca cereales como el maíz, el trigo, el arroz o el sorgo (Ireta y Gilchrist, 1994). La toxicidad genética de especies de *Fusarium* es ahora reconocida como uno de los mayores problemas en la agricultura. Las extensivas investigaciones de las dos décadas pasadas han revelado un gran número de metabolitos secundarios tóxicos (Miller y Trenholm, 1994).

F. graminearum produce metabolitos que tienen diversos orígenes biogénicos y tóxicos. Algunos de estos compuestos son micotoxinas y a otros no se les conoce su función (Ireta y Gilchrist, 1994). Las micotoxinas que más produce este patógeno son deoxynivalenol (DON), nivalenol (vomitoxinas) y zearalenona (ZEA); produciendo en mayor cantidad DON (Reid *et al.*, 1996; McMullen *et al.*, 1997; Bowden y Leslie, 1999; Nyvall *et al.*, 1999; Du Toit y Pataky, 1999; Salas *et al.*, 1999).

Salas *et al.* (1999) mencionan que todos los aislamientos de *F. graminearum* produjeron DON en un rango de 14.4 a 56 ppm y 15 acetyldeoxynivalenol en un rango de 1.4 a 7.0 ppm. Por otra parte, Mesterhazy (1996) reporta que DON se encontró en concentraciones de < 80 a $> 1\,000\text{ mg kg}^{-1}$ y los niveles de ZEA $< 100\text{ mg kg}^{-1}$.

Los efectos tóxicos de los metabolitos son variados, dependiendo del consumidor. Los cerdos muestran ser los más afectados, seguidos por el ganado vacuno y finalmente, por el ganado aviar (Ireta y Gilchrist, 1994).

La toxina DON puede inducir vómitos en cerdos, pérdida de apetito y de peso (Reid, 1996). En concentraciones de $\geq 2\text{ mg kg}^{-1}$ en alimento producen inapetencia y

disminución de la ganancia de peso, vómito y rechazo en concentraciones de $\geq 20 \text{ mg kg}^{-1}$ de alimento (Ireta y Gilchrist, 1994). Induce también espasmos musculares y vómitos en humanos (Nyvall *et al.*, 1999).

Zearalenona es un estrógeno (Ries, 1996), que puede ocasionar enrojecimiento e hinchamiento de vulva, prolapso vaginal y en ocasiones prolapso rectal en los cerdos; las lechonas pueden presentar problemas de fecundidad (Ireta y Gilchrist, 1994).

La toxina T_2 es aproximadamente 10 veces más tóxica que el deoxinivalenol para mamíferos, ocasionando disminución de la ingestión de alimentos, irritación cutánea y gastrointestinal, neurotoxicidad, crías con anomalías, mayor sensibilidad a enfermedades y hemorragias; sin embargo, es menos tóxica para las variedades de trigo (Ireta y Gilchrist, 1994).

Existen algunos reportes en Rusia, Argentina, Japón y China del efecto que causa el grano dañado al ser consumido por seres humanos. En china se han realizado estudios epidemiológicos del cáncer esofágico y se ha encontrado que está ligado a la exposición de altas dosis de *F. moniliforme*, el cual se ha demostrado que produce una gran cantidad de toxinas. La ingestión crónica de pequeñas cantidades de tricotecenos puede provocar efectos secundarios importantes como la supresión del sistema inmunológico a la predisposición a enfermedades infecciosas. Se deben tomar precauciones para no inhalar el polvo o esporas de *Fusarium* y evitar el contacto directo de la piel con granos infectados. La regulación de manejo del grano infectado se realiza sólo en algunos países. En Estados Unidos los niveles admitidos por la Administración de Alimentos y Drogas (Food and Drug Administration) en grano y harina de trigo son de 2.0 y 1.0 mg kg^{-1} , respectivamente (Ireta y Gilchrist, 1994). En la naturaleza, la patogenicidad sobre

las mazorcas de maíz y espigas de trigo parece estar correlacionada con la producción de DON y 15 acetildeoxinivalenol (15- ADON) (Ireta y Gilchrist, 1994).

Reid *et al.* (1996) y Salas *et al.* (1999) reportan que los niveles de toxina están correlacionados con la evaluación visual de la severidad de la enfermedad. La contaminación de los granos con toxinas es proporcional a la severidad de la infección de los granos de la espiga. Cuando no se observa infección, la concentración de DON no es detectable (Mesterhazy, 1996). Los altos niveles de DON sólo se encuentran en plantas severamente infectadas y los bajos niveles de toxina se relacionan con una baja incidencia en campo de la enfermedad (Piñeiro, 1996). La invasión de los granos por *Fusarium* destruye los gránulos de almidón, el almacenamiento de las proteínas y la pared celular, dando por resultado un producto de baja calidad (Ireta y Gilchrist, 1994).

2.5. Control

Para reducir el riesgo de una epidemia se deben realizar medidas de control como por ejemplo: las técnicas culturales, el uso de fungicidas, además de las variedades resistentes, con las cuales se disminuye la cantidad de inóculo, se previene su dispersión y se protege de la infección a la espiga (Parry *et al.*, 1995).

La importancia de la **rotación de trigo** con cultivos tales como trébol, alfalfa, papa, lino y maíz para el control del tizón de la espiga fue propuesto por Bolley desde 1913. Las recientes investigaciones sugieren que la rotación maíz-trigo incrementa la incidencia de la enfermedad (Abramson, citado por Parry *et al.*, 1995); Pero el **enterrar o eliminar los residuos de cosecha** disminuye la viabilidad del patógeno (Wilcoxson, citado por Parry *et al.*, 1995). Aunque la transmisión por semilla no es un factor importante en la diseminación de la enfermedad, es conveniente **usar semilla**

certificada, pues de esta manera se controla mejor la incidencia de cualquier patógeno y se asegura un mayor vigor (Ireta y Gilchrist, 1994).

El **uso de fungicidas** es una medida complementaria de control cuando las condiciones ambientales son favorables para el desarrollo de la enfermedad en la floración de trigo (Galich, 1996). Uno de los fungicidas más efectivos es tebuconazole (triazole) (Galich, 1996; Parry *et al.*, 1995). Por otra parte, Dill-Macky (1996) reporta que Benlate (benomyl) es de los fungicidas más efectivos y está registrado su uso en trigo en los Estados Unidos. Sin embargo, Parry *et al.* (1996) reportan que en una prueba de efectividad, rango de efectividad y rango de aplicación de fungicidas en invernadero, el tebuconazole y prochloraz aplicado 7 días antes de la inoculación, fueron los más efectivos en el tratamiento pre-inoculación; en el tratamiento post-inoculación tebuconazole, chlorothalonil y prochloraz presentaron una reducción significativa de la severidad de la enfermedad; en el tratamiento de 5 días post-inoculación sólo prochloraz redujo significativamente la severidad. Los fungicidas triazole, triadimefon y propiconazole redujeron la enfermedad en un 39 a 61%, y también redujeron la concentración de DON en 34 a 79% (Parry *et al.*, 1995). Se tienen reportes de que tridemorph en 6 a 8 ppm inhibe la producción de la micotoxina T₂ para *F. sporotrichioides*, pero incrementa el crecimiento fungoso; con altas concentraciones de 30 a 50 ppm el fungicida inhibe el crecimiento fungoso alrededor del 50%, pero estimula la concentración de micotoxina T₂ (Moss y Frank, citado por Parry *et al.*, 1995). Uedo y Yoshizawa en 1988 encontraron que thiophanate-methyl aplicado a la emergencia de espigas y antesis reduce la incidencia de la enfermedad y la contaminación por DON y nivalenol (Parry *et al.*, 1995). En Brasil Neto y Giordani

(1989) reportan que la aplicación de tiabendazol (500 g i.a. ha⁻¹) y carbendazim (250 g i.a. ha⁻¹) resultaron con el menor porcentaje de granos infectados.

El uso de **variedades resistentes** es el método de control más utilizado. Se han reportado tres mecanismos de resistencia en las plantas de trigo. La del **tipo 1** referida a la resistencia de penetración, que previene la penetración inicial del hongo; la del **tipo 2** es resistencia a la expansión, en donde el crecimiento del hongo se reduce al punto de penetración (al grano); la de **tipo 3** está relacionada a la resistencia bioquímica en donde las toxinas producidas por el hongo son degradadas por la planta (Gilchrist *et al.*, 1996). Sin embargo, Wan y Miller, citados por Parry *et al.* (1995), reportan que existe resistencia de **tipo 4** que es la tolerancia a altas concentraciones de DON.

Se considera que la heredabilidad de la resistencia a *F. graminearum* es de tipo poligénico (Ireta y Gilchrist, 1994). Algunos autores proponen que existe un gen dominante y algunos menores en la variedad Sumai 3, mientras que otros reportan dos o tres genes mayores; esto concluye que la resistencia esta controlada sólo por unos pocos cromosomas (Buerstmayr *et al.*, 1996). Snijder reporta que el número de genes segregantes que gobierna la resistencia es entre uno y seis (Parry *et al.*, 1995).

La resistencia a *Fusarium* es cuantitativa, debido a que la resistencia completa no se ha descubierto. La resistencia en plantas es controlada por dos a cinco genes mayores y el resto son genes menores (Miller y Trenholm, 1994).

Por muchos años, la resistencia al tizón de la espiga se ha concentrado en el tipo 1 y 2 (Gilchrist *et al.*, 1996). La baja compatibilidad de la resistencia, características agronómicas pobres y baja calidad de las fuentes de resistencia conocidas, así como los problemas de la selección por el método convencional (Galich, 1996), han ocasionado la búsqueda de otros métodos para obtener material resistente, como el uso de la ingeniería

genética en la introducción de genes exógenos en trigos duros, destacando la producción de mutantes transformados con el gen *tri5*, el cual es responsable de la producción de tricotecenos (Desjardins *et al.*, 1996).

En la actualidad en la mayoría de las líneas resistentes de China, se ha encontrado que altos niveles de resistencia (expresados como una baja severidad de la enfermedad), se combina con bajos niveles de concentración de DON. El seleccionar estas líneas y utilizar técnicas moleculares para identificar los genes de resistencia de tipo 3, deben ser la pauta a seguir en la búsqueda de resistencia al tizón de la espiga del trigo (Piñeiro, 1996).

2.6. Especialización patogénica

Existe una especialización patogénica de *F. graminearum* en relación con su lugar de ataque en las plantas de trigo; esta situación ha dado lugar a la formación de dos poblaciones del hongo denominadas Grupo I ó heterotálico y Grupo II u homotálico (Kommedahl, citado por Ireta y Gilchrist, 1994).

El **grupo I** es un hongo del suelo que ocasiona pudriciones de la raíz y corona del trigo y otros granos. Se encuentra en gran cantidad en las regiones de Australia, Sur de Africa y Estados Unidos. No se obtienen peritecios de cultivos monoconidiales, se dice que este grupo es heterotálico y / o infértil (Francis, citado por Bowden y Leslie, 1996; Smiley y Patterson, 1996).

El **grupo II** es un patógeno aéreo que ocasiona la enfermedad del tizón de la espiga de trigo y ataca a otros granos pequeños. Los miembros de este grupo son homotálicos, producen abundantes peritecios en campo y bajo condiciones de laboratorio (Francis, citado por Bowden y Leslie, 1996).

Cullen *et al.*, citados por Bowden y Leslie (1996) diferenciaron dos subgrupos de *G. zeae* para la roña de la mazorca en maíz. El **tipo A** es patogénico a maíz, de rápido crecimiento, produce colonias con pigmentaciones rojas, abundante micelio aéreo y variación en los niveles de zearalenona. El **tipo B** es no patogénico a maíz de bajo crecimiento y produce apresorios, colonias de coloración amarillo oscuro y altos niveles de zearalenona. La relación de los aislamientos A y B no se conoce, pero es posible que el tipo sea infectado por un mycovirus; sólo se ha reportado esta evidencia de especialización patogénica en *G. zeae*.

Las observaciones realizadas en los aislamientos colectados en los estados de Jalisco, Michoacán y México, indican que el grupo II de *F. graminearum* es el que prevalece en estas regiones. Los daños siempre se han observado en las espigas y ocasionalmente sobre las raíces y corona. En algunas áreas como el estado de México (Juchitepec, Ozumba y Temamatla) se le ha encontrado asociado con otros hongos, ocasionando daños a la raíz y corona (Ireta y Gilchrist, 1994).

2.7. Especialización fisiológica

Mesterhazy, citado por Parry *et al.* (1995) reporta el trabajo de cuatro cultivares de trigo y dos especies de *Fusarium* encontrando una respuesta similar de los cultivares a *F. graminearum* y *F. culmorum*. Por otra parte, en una serie de experimentos donde se inoculó a especies de *Fusarium* en cultivares de trigo, se observaron pequeñas diferencias en respuesta a *F. graminearum* y *F. culmorum* (Stack y McMullen, citados por Parry *et al.*, 1995).

Es fácil observar en los medios de cultivo las diferencias entre los hongos del tizón de la espiga colectados en distintas regiones. Esas diferencias conciernen principalmente al

color de la colonia, la tasa de crecimiento, la producción de peritecios, etc. Hasta el momento no han sido concluyentes los informes relacionados con las diferencias en cuanto a la patogenicidad o razas fisiológicas (Kohli, 1989).

En China se reportan diferencias significativas de patogenicidad entre aislamientos de *F. graminearum* que se dividieron en tres tipos: fuerte, moderado y débilmente patogénico. Estos resultados muestran diferencias significativas de patogenicidad entre aislamientos de *F. graminearum* para lugares con diferentes regiones ecológicas que presentan frecuencia de epidemias. La incidencia de aislamientos altamente patogénicos para las regiones de alta frecuencia de epidemias, fue mucho más alta que para las regiones con baja frecuencia de epidemias (Wang, 1996).

En la provincia de Jiangsu, la virulencia de 102 aislamientos de *F. graminearum* fue determinada en nueve cultivares de trigo. Se encontraron diferencias en el grado de virulencia de los aislamientos y grado de resistencia de los cultivares de trigo; sin embargo, cuando los grados de virulencia de los aislamientos fueron promediados por regiones, la diferencia no fue significativa por región de colecta. Los resultados de este trabajo indican que no se encontró especificidad patogénica de aislamientos (Wang, 1996). Chen *et al.* (1996), también reportan diferencias significativas de aislamientos de *F. graminearum* para diferentes regiones, sin embargo, estas diferencias no indican especialización fisiológica.

Snijders, citado por Parry *et al.* (1995) separó aislamientos de *F. culmorum* dentro de tres grupos patogénicos y los inoculó en 18 genotipos de trigo, donde identificó siete aislamientos con genes específicos de razas; sin embargo, en trabajos posteriores Snijders, Van Ecuwijk y Mesterhazy, citados por Parry *et al.* (1995) reportan que la interacción aislamiento-genotipo fue significativa en el patosistema, pero esta relación

no fue estable en otros experimentos y sólo afectó un pequeño rango de cultivares; esto no determina la presencia de razas en las especies de *Fusarium* que atacan al trigo. Miller y Trenholm (1994) mencionan que no se han encontrado evidencias de que existan razas de *F. graminearum* y *F. culmorum* adaptadas a diferentes genotipos de trigo.

En experimentos realizados en Uruguay durante los años 1991-1993 para identificar variabilidad patogénica de *F. graminearum*, se obtuvieron 14 aislamientos monospóricos de colectas y fueron inoculados en tres líneas diferenciales de trigo; cada una reaccionó diferente bajo condiciones de campo. Estas diferencias fueron probadas en invernadero, 10 de los 14 aislamientos monospóricos durante los tres años de estudio de variabilidad patogénica mostraron diferencias significativas entre aislamientos pero no entre cultivares; la interacción entre cultivar/año fue altamente significativa, mostrando variación en el nivel de infección de algunos cultivares de un año a otro; las interacciones entre aislamiento/cultivar y aislamiento/año no fueron significativas. Estos resultados confirman estudios anteriores, donde indican que las diferencias significativas de aislamientos de *F. graminearum* son por agresividad más no por virulencia.

En recientes experimentos se han utilizado técnicas moleculares como solubilidad de proteínas, isoenzimas, polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción de ADN (RFLP's) y polimorfismos de ADN amplificados al azar (RAPD's), para analizar la variabilidad patogénica entre aislamientos de *F. graminearum*. Pritch, citado por Díaz de Ackema y Kohli (1996), menciona que por medio de RAPD's se lograron observar dos bandas OPV-05/3 y OPV-19/9 que identifican aislamientos de *F. graminearum*.

Por lo reportado en la literatura, el uso de RAPD's ha sido muy amplio para la identificación, cuantificación y especialización fisiológica de especies, tanto de

Fusarium como de otros géneros de hongos, pero no para analizar posible variabilidad patogénica en aislamientos de *F. graminearum*.

Así pues McDonald, citado por Leyva (1998) menciona la existencia de una gran diversidad en la cadena de ADN entre aislamientos y poblaciones de *S. tritici* sin indicar la posible correlación entre esta diversidad genotípica con características de virulencia o agresividad del hongo en variedades de trigo.

2.8. Utilización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en *Fusarium* (PCR)

La PCR es un proceso bioquímico *in vitro*, mediante el cual las cadenas individuales de ADN blanco son duplicadas por la ADN polimerasa en cada uno de los ciclos que integran la reacción; al final de cada ciclo las nuevas cadenas vuelven a ser duplicadas por la misma enzima, lográndose una producción exponencial de millones de copias del gen o segmento de ADN específico sometido al proceso. En general, los componentes requeridos para PCR son: ADN, iniciadores que flanquean el gen o segmento que actúa como blanco para la amplificación, mezcla de desorribonucleótidos (dNTP's), amortiguador y ADN polimerasa. Cada uno de los ciclos de la reacción consta de tres pasos que están determinados por temperaturas y tiempos específicos que son: desnaturalización (92 a 98 °C, 30 a 90 seg.) en el cual se separan las dos cadenas complementarias del ADN blanco; alineamiento (50 a 60 °C, 30 a 60 seg.), en el que se realiza el pareamiento específico entre los iniciadores y las cadenas simples del segmento de ADN blanco desnaturalizado; extensión (70 a 74 °C, 30 a 90 seg.) en el que la ADN polimerasa extiende la longitud de los iniciadores pareados al ADN blanco, al ir polimerizando los desorribonucleótidos libres resultando nuevas cadenas complementarias a las dos cadenas sencillas libres (McPherson *et al.*, 1992).

La utilización de las técnicas moleculares según Dill-Macky (1996), es una de las principales herramientas para la búsqueda de material resistente al tizón de la espiga del trigo en donde destaca el empleo de marcadores moleculares en genes que confieren resistencia, así como el mapeo genómico del material resistente. Otro de los objetivos es el desarrollo de marcadores moleculares que distingan entre *F. culmorum*, *F. graminearum* y otras especies de *Fusarium*, además de que sean capaces de identificar aislamientos individuales y razas fisiológicas de *F. graminearum*.

Las pruebas de PCR son muy sensibles y selectivas para detectar especies individuales de *Fusarium*, tomando muestras de cualquier parte de tejido infectado de la planta y en diferentes grados de severidad. Además puede ser una prueba invaluable en el diagnóstico y estudio epidemiológico y especialmente útil para analizar la competencia entre diferentes especies de patógenos durante la invasión y colonización de la enfermedad (Schilling *et al.*, 1996).

Gilbert *et al.* citado por Buerstmayr *et al* (1996) utilizaron 600 iniciadores de RAPD's y encontraron una banda posiblemente asociada con resistencia en el cultivar chino Sumai 3

Por su parte, Ban (1996) utilizó RAPD's para la selección indirecta de genes de resistencia o QTLs., de los 65 iniciadores que analizó en líneas de doble haploidia F1, se encontró respuesta con cuatro marcadores: OP2-10₆₈₀, OPAG-18₆₄₀, OPAF-06₃₄₅ y OPW-13₃₄₅.

También Nicholson *et al.* (1996) mencionan el uso de PCR para la identificación de especies de *Fusarium* del complejo de la enfermedad, así como para detectar la cantidad de patógenos presentes en los tejidos de la planta; esta técnica además evalúa efectos de los factores como la variedad cultivada, tratamientos fungicidas y las condiciones de

cada hongo, reportando que es posible el desarrollar estrategias de control. Además, mencionan el uso de RAPD's y RFLP para investigar la distribución y polimorfismo dentro de rangos homólogos del gene Tri5 en especies de *Fusarium*. El gene Tri5 es considerado el responsable de la producción de los tricocenos, relacionados con el nivel de virulencia de los aislamientos de *Fusarium*.

Otras investigaciones donde se ha hecho uso de RAPD's, es la identificación de especies y genotipos de *F. culmorum* y *F. graminearum* con el iniciador 17 del Kit "T" de OPERON, reportando una variabilidad genética intraespecífica altamente significativa de 0.59 y 0.87 respectivamente, y una fácil y rápida identificación de especies (Schilling *et al.*, 1994).

Nicholson *et al.* (1998) desarrollaron iniciadores específicos para *F. culmorum* y *F. graminearum* Fc01F/R y Fg16F/R, respectivamente para la detección y cuantificación del patógeno utilizando los iniciadores OPERON (OP-T01, OP-T16 y OP-U17), y sondas de hibridación y digestión (EcoRI); los productos fraccionados fueron amplificados y clonados en *E. Coli*, los clones se secuenciaron y analizaron por medio del láser automático fluorescente de secuencias de ADN; los datos obtenidos se llevaron a un programa de selección de iniciadores de PCR. Este trabajo evidencia una fuerte relación entre estas dos especies, por ejemplo el análisis de los espacios de transcriptasa interna (ITS), región de ADNr muestra que no existen diferencias entre *F. culmorum*, *F. graminearum* y *F. crookwellense*. Estudios de esta región señalan que la ADNr de 28S no presenta alguna diferencia para poder separar especies. Análisis de secuencias similares a la región de ADNr 28S revelan que *F. culmorum* y *F. graminearum* difieren por solo 4 de 352 nucleótidos (1.1%).

Doohan *et al.* (1998), mostraron la sensibilidad de PCR en la identificación de las especies de *Fusarium* aún en muestras asintomáticas y sugieren su utilización en pruebas de diagnóstico, ya que se ha logrado identificar un iniciador específico Fp82 F R para detectar aislamientos de *F. poae*, aún cuando se encuentren en asociación con otras especies de *Fusarium* (Parry y Nicholson, 1996).

También se ha utilizado PCR como un método inequívoco de identificación de aislamientos de *F. oxysporum f. sp. basilici* y diferenciación de especies saprófitas de *Fusarium* (Chiocchetti *et al.*, 1999).

En 54 aislamientos de *F. poae* de diferentes regiones geográficas, donde se utilizó el Kit E (Operon technologies Inc.), con los iniciadores OPE-03, OPE-07, OPE-15 Y OPE-18, se encontró una subdivisión intraespecífica, aún cuando es un hongo oportunista que no está sujeto a una presión de selección (Kerenyi *et al.*, 1997)

La diferenciación de *F. oxysporum f. sp. radicis-cucumerinum* y *F. oxysporum f. sp. cucumerinum* se basaba sólo en diferencias en síntomas y temperaturas óptimas para el desarrollo de la enfermedad; un estudio más objetivo fue el correlacionar las diferencias en el desarrollo de la enfermedad por medio de RAPD's utilizando 22 iniciadores al azar OPA-01, OPB-01 a OPB-20 y OPF-05 (Operon Technologies, Inc.) obteniendo productos de 0.2 a 2.3 Kb. Los resultados revelan fuerte correlación entre características, indicando que estas dos formas especiales son genéticamente distintas (Vakalounakis y Fragkiadakis, 1998).

Por medio de pruebas de RAPD's con el Kit A (Operon Technologies, Inc.), se caracterizaron aislamientos de *F. oxysporum f. sp. lycopersici* raza 1, mostrando una subdivisión de aislamientos de acuerdo a la presencia o ausencia de un gen avirulento

que corresponde al gen *I-2* de resistencia en los cultivares de tomate; esto nos dice que se trata de una resistencia gen a gen (Mess *et al.*, 1998).

La diferenciación de especies saprófitas y patogénicas de *F. solani* f. *sp. phaseoli* se logró utilizando RAPD's con los iniciadores OPE-01 a OPB-19, OPE-02 a OPE-05, OPE-07 a OPE-09, OPE-11 a OPE-17 (Operon Technologies Inc.) (Achenbach *et al.*, 1996).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Colecta de semilla

El inóculo se obtuvo de semilla enferma colectada en los siguientes sitios: Potzumarán, Mich., Chapingo, Méx., Juchitepec, Méx., Calpulalpan, Tlax., Tepatitlán, Jal., Cuyuaco, Pue., Bonilla, Mich., Jesús María, Jal., y Metepec, Méx., donde se cultiva trigo de temporal.

3.2. Aislamiento e identificación de *Fusarium graminearum*

Se utilizaron semillas que mostraron daños tales como arrugamiento y manchas de color rojo o negro. Las semillas fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio (1:10) durante 1 minuto y colocadas en cajas petri con medio nutritivo de jugo de tomate (90 mL de jugo de tomate, 20g de agar, 4g de Carbonato de Calcio), sembrando ocho semillas por caja; se obtuvieron un total de 24 semillas por sitio muestreado bajo luz continua. Después de 48 h se observó crecimiento de las colonias, se aisló a *F. graminearum*, el cual se identificó de acuerdo a (Warham *et al.*, *S.F).

3.3. Aislamientos monoconidiales

Con la finalidad de obtener aislamientos producidos a partir de un solo macroconidio y evitar la variabilidad genética, se procedió a hacer aislamientos monoconidiales. Para esto se utilizó una espátula estéril con la cual se raspó en el aislamiento del cual se quería obtener el crecimiento de un solo macroconidio; este

raspado se colocó en un tubo de ensayo con 10 mL de agua destilada estéril, se agitó para dispersar los macroconidios, y se tomó 1 mL de esta suspensión, la cual se agregó a un tubo con 9 mL de agua estéril, obteniéndose una dilución de 1:10. De esa suspensión se tomó 1 mL con una pipeta estéril que se vertió en una caja de petri sobre la superficie del medio de cultivo mojando toda el área y escurriendo el exceso. Las cajas fueron selladas y se colocaron bajo luz constante; a las 48 h se observó el crecimiento de las colonias, se ubicó aquella que estuviera aislada de las demás, con lo que se evitó el intercambio de información genética y se aseguró que provenía de un solo macroconidio y fue transferida a otra caja petri.

3.4. Producción de inóculo

La producción de inóculo se realizó con la finalidad de obtener una suspensión de macroconidios viables a partir de un aislamiento monoconidial para la inoculación de espigas. En total se obtuvieron diez aislamientos etiquetados de la manera siguiente: A1 (Juchitepec), A2 (Meteppec II), A3 (Meteppec I), A4 (Bonilla), A5 (Jesús María), A6 (Cuyuaco), A7 (Chapingo), A8 (Calpulalpan), A9 (Potzumarán), A10 (Tepatitlán). Estos aislamientos provinieron de conidios individuales y se desarrollaron en medio líquido nutritivo de frijol chino (se pone a hervir 20gr de frijol chino durante 30 min, se toma el caldo y es aforado a 1L con agua destilada), en matraces de 125 mL que contenían 100 mL de medio estéril, al que se le agregó un pequeño trozo del aislamiento monoconidial. Posteriormente el matraz fue colocado en un agitador en movimiento continuo a 800 rpm durante 15 días bajo luz continua a temperatura ambiente. El micelio creció en forma globosa y los conidios dispersos en el medio líquido.

3.5. Hospedero

Fueron seleccionados seis genotipos de trigo harinero que fueron los siguientes: Tolerantes: Buc/Alucan, Chil/Chum 18 y Milán; susceptibles: Gálvez M87, Pavón F76 y Zacatecas VT74. La semilla fue proporcionada por el programa de trigo del Campo Experimental Valle de México (CEVAMEX) perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias y fue sembrada en macetas en los invernaderos de Parasitología Agrícola en Abril de 1999, a manera de dejar durante el amacollamiento cinco plantas por maceta.

3.6. Inoculación

Se inoculó un aislamiento por cada sitio de colecta; en total fueron diez aislamientos monoconidiales. El inóculo utilizado fue la suspensión de macroconidios del medio líquido y se ajustó a una concentración de 200,000 macroconidios por mL. A cada suspensión se le agregó Tween 20 como adherente y las espigas inoculadas se encontraban en el estado fenológico de antesis, considerado el de mayor susceptibilidad. Se tomaron diez espigas por genotipo para cada aislamiento y el método de inoculación utilizado fue el del algodón, que consiste en implantar pequeñísimos copetes de algodón impregnados con conidios bajo una de las glumas de espiguillas ubicadas en el tercio medio de la espiga y luego cubrirlas con bolsa de glacié, manteniendo a la planta durante 72 h en cámara húmeda, a una humedad relativa de casi 100%. Después las macetas se colocaron a temperatura ambiente entre 25 y 30 °C durante 18 días.

3.7. Evaluación

La evaluación del daño se realizó 18 días después de haber sido retiradas las macetas de la cámara húmeda; se cortó la espiga y se contó el número de espiguillas enfermas por espiga. La escala utilizada se indica en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Escala de evaluación para el tizón o roña de la espiga del trigo *F. graminearum*.

ESCALA	ESPIGUILLAS ENFERMAS EN UNA ESPIGA	NIVEL DE RESISTENCIA
0	0	Inmune
T	1	Altamente resistente
1	1-2	Resistente
2	2-4	Moderadamente resistente
3	5-6	Moderadamente susceptible
4	>7	Susceptible
5	Toda la espiga	Altamente susceptible

Tomado de: CIMMYT Report on Wheat Improvement , 1988.

3.8. Análisis de datos

El diseño experimental empleado para el análisis de datos fue el de parcelas apareadas, donde la parcela consistió de las variedades y los bloques fueron las repeticiones de los aislamientos. Se analizó por medio del programa SAS, obteniendo análisis de varianza y comparación de medias mediante la prueba de Tukey.

3.9. Extracción de ADN de *F. graminearum*

Con la finalidad de observar las diferencias a nivel molecular de los diez aislamientos de diferentes sitios de colecta, se procedió a la extracción de ADN

utilizando el método de George *et al.*(1998), ajustandolo para *F. graminearum*. El micelio utilizado para la extracción de ADN fue producido de igual forma que el utilizado en las inoculaciones de espigas, sólo que este se produjo en oscuridad para obtener mayor cantidad de micelio y menor de conidios.

Cosecha y congelación. El micelio fue cosechado con una bomba de vacío colocando el crecimiento fungoso en un embudo buchner, sobre un matraz kitasato. Una vez extraído el medio líquido, el micelio deshidratado se congeló con nitrógeno líquido y se trituró en un mortero con pistilo, hasta obtener un polvo fino.

Extracción de ADN. Cada muestra fue de 500 mg de micelio deshidratado, que una vez triturado se colocó en tubos eppendorf de 1.5 mL y resuspendido en 900 µL de buffer de extracción (100 mM Tris pH 8; 100 mM EDTA; 250 mM NaCl, y Sulfato de Sodio Dodecil al 1% pt/vol) a 65 °C durante 1h en agitación continua.

Las proteínas y residuos celulares se precipitaron con 300 µL de Acetato de Potasio (3M Potasio y 5M Acetato pH 4.8) en hielo durante 45 min a 1 h, los tubos se centrifugaron durante 10 min a 8160 g, se recuperó el sobrenadante y se le agregó $\frac{3}{4}$ del volumen recuperado de Isopropanol frío (para precipitar el ADN), dejandolo a -20 °C durante 45 min a 1h, después se centrifugó a 8160 g durante 5 min. Se eliminó el sobrenadante (Isopropanol).

El precipitado fue resuspendido en 150 µL de solución para diluir (50 mM HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0). Una vez disuelto el ADN, se agregaron 2 µL de ARNasa incubándolos durante 2 h a 37 °C para eliminar ARN presente. Posteriormente a los tubos se les agregaron 50 µL de Acetato de Sodio 3M y 150 µL de Isopropanol para precipitar al ADN a -20 °C. Después se centrifugaron a 8160 g

durante 5 min, se eliminó el sobrenadante y se agregaron 150 μ L de Etanol al 70%, para retirar el exceso de sales, se volvió a centrifugar a 8160 g durante 3 min. El sobrenadante fue eliminado y los tubos se dejaron de 20 a 30 min a temperatura ambiente para secar al ADN, que finalmente se disolvió en 100 μ L de TE (10 mM HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0).

3.10. Cuantificación de ADN

La cuantificación del ADN se realizó en un espectofotómetro Perkin Elmer uv/vis LambdaBio a una absorbancia de 260 y 280 nm utilizando una dilución de 1:10. La calidad del mismo fue visualizada por electroforesis en un gel de agarosa al 8%.

3.11. Estandarización de los componentes de la Reacción en Cadena de la Polimerasa

Se seleccionaron los iniciadores que mostraron amplificación con el ADN de los aislamientos. La cantidad y concentración de los componentes que integran la mezcla de reacción fueron según Kelly *et al.* (1994): 3.35 μ L de Agua bidestilada; 2.5 μ L de Amortiguador (10X) GIBCO BRL; 0.75 μ L de $MgCl_2$ (1.5 mM) GIBCO BRL; 6.0 μ L de ADN (25 ng/ μ l); 2.0 μ L de Iniciador (20 pmol) ROTH; 0.4 μ L de ADN Taq. Polimerasa. GIBCO BRL (2U).

En un tubo eppendorf de 1.5 mL se preparó la mezcla de reacción para 20 reacciones. Cada muestra de 25 μ L fue cubierta con 25 μ L de aceite mineral para evitar pérdidas por evaporación en el termociclador. Se evaluó el kit de la serie "C" marca ROHT (20 iniciadores). Cabe mencionar que todos los procesos se realizaron

con guantes y cubreboca. La amplificación se realizó en un termociclador Perkin Elmer 480 bajo el programa que se muestra en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Programa de amplificación de RAPD's

Temperatura °C	Ciclo	Tiempo segundos	Fase
94	1	60	Pre-desnaturalización
94	38	30	Desnaturalización
35		30	Alineamiento
72		90	Extensión
72	1	150	Extensión final

Los fragmentos de ADN amplificados se observaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.2 % y TAE 1X, colocando en cada pozo 10 µL de cada reacción, y se dejó 1h 45" para la migración y separación de los fragmentos de ADN. Posteriormente el gel se tiñó con bromuro de etidio y se identificó a los iniciadores con los que existió amplificación. Se eligió a uno de éstos para hacer las pruebas de estandarización óptima de ADN, MgCl₂ y enzima. Para ADN se hicieron pruebas de 100, 125 y 150 ng (nanogramos), con MgCl₂ de 1, 1.5, 2.0 y 2.5 mM y de enzima 1.5, 2.0 y 2.5 Unidades / reacción. Todas estas pruebas se hicieron bajo las mismas condiciones de ciclaje que fueron utilizadas para determinar los iniciadores; se utilizó ADN de un solo aislamiento y el resultado se observó por electroforesis.

3.12. Amplificación de ADN de aislamientos de *F. graminearum*

Una vez obtenidas las condiciones óptimas de los componentes de la mezcla de reacción, se realizaron las amplificaciones con los iniciadores seleccionados bajo el mismo programa del termociclador. Los fragmentos amplificados de ADN se observaron en un gel de agarosa al 1.2% y TAE 1X por electroforesis, colocando en cada pozo 10/25 μ L de reacción. Se incluyeron dos muestras de 3 μ L (a una concentración de 300 ng / μ L) de marcador de peso molecular GIBCO de 1000 pb en los extremos del gel y se dejó correr 1h 45 min a 80 Volts. El gel se tiñó en bromuro de etidio y se observó en luz UV, los geles fueron documentados directamente en la computadora en el programa de Kodak Digital ScienceID (KDS ID 2.0).

3.13. Evaluación

El patrón de bandas detectado con cada iniciador para los diez aislamientos se analizó, identificando la presencia o ausencia de un fragmento de ADN en particular, para lo cual se asignó el valor de 1 si una banda en particular se encontraba y si esa banda estaba ausente en otro individuo que se estaba comparando se daba el valor de 0; se realizó una matriz binaria con los datos de la amplificación con todos los iniciadores en los diez aislamientos. Esta matriz de datos con valores de 0 y 1 fue analizada en el programa computacional NTSYS-PC 2.0 diseñado por Rohlf (1989), generando una gráfica de agrupamientos de los aislamientos por similitud de bandas amplificadas entre ellos (Dendograma).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Aislamientos de *Fusarium graminearum*

El crecimiento de micelio de los aislamientos presentó un aspecto algodonoso y de color rosa a rojo, tal y como se observa en las Figuras 1 y 2. Los macroconidios observados al microscopio fueron en forma de canoa, con la célula basal en forma de pie, de 3 a 7 septas y de color hialino. Las estructuras observadas corresponden con lo descrito por Warham *et al.*, (S.F.) para *F. graminearum*.

4.2. Inoculación de espigas

El genotipo Gálvez y el genotipo Chil/Chum 18 inoculados con el aislamiento A1 se observan en las Figuras 3 y 4. Los datos obtenidos en función del daño presente en las espigas fueron evaluados de acuerdo a la escala del Cuadro 1 y analizados por la prueba de comparación de medias de Tukey, mostrando los resultados en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Agrupación de medias de Tukey de acuerdo al nivel de resistencia de las variedades inoculadas con *F. graminearum*.

GENOTIPO	MEDIA (# de espiguillas dañadas por espiga)	AGRUPAMIENTO TUKEY
Gálvez	4.30	A
Pavón	4.24	A
Zacatecas	4.16	A
Buc/Alucan	3.74	B
Milán	3.72	B
Chil/Chum 18	3.70	B

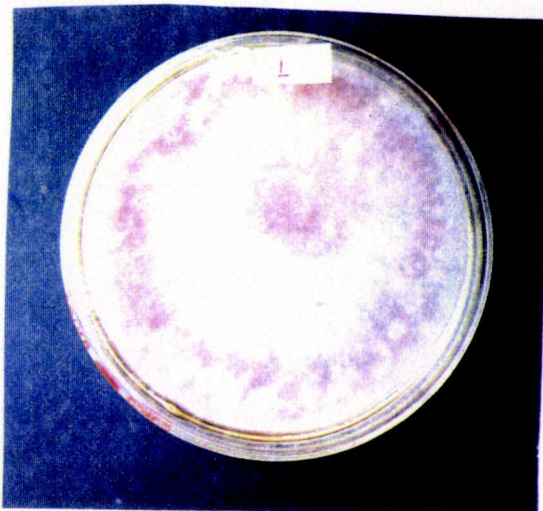


Figura 1. Aislamiento A9 de *F. graminearum*

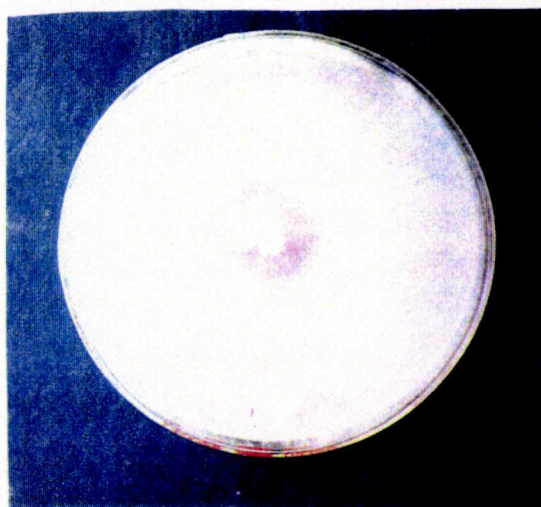


Figura 2. Aislamiento A2 de *F. graminearum*.



Figura 3. Genotipo Gálvez inoculado con A1



Figura 4. Genotipo Chil/Chum 18 inoculado con A1

El Cuadro 3 muestra las dos agrupaciones formadas por los diferentes aislamientos, el grupo A con una media de 4.2, considera como susceptibles a los genotipos Gálvez, Pavón y Zacatecas de acuerdo con la escala de evaluación del Cuadro 1; lo cual concuerda con lo reportado por CEVAMEX, 1999 en experimentos de campo. El grupo B presenta una media de 3.7 y considera a los genotipos Buc/Alucan, Milán y Chil/Chum 18 como moderadamente susceptibles a susceptibles, lo cual difiere por lo reportado por CEVAMEX, 1999, que observo a estos genotipos como resistentes bajo condiciones de campo Cuadro 4.

Cuadro 4. Porcentaje de área foliar dañada bajo condiciones de campo por el complejo de enfermedades foliares en genotipos de trigo, verano de 1999.

Genotipo	% de área foliar dañada	Clasificación
Gálvez M 87	100	Susceptible
Pavón F 76	90	Susceptible
Zacatecas VT 74	90	Susceptible
Buc/Alucan	20	Resistentes
Milán	30	Resistentes
Chil/Chum 18	30	Susceptible

Fuente: Programa de trigo del CEVAMEX.

Daño promedio de: Potzumarán, Mich., Bonilla, Mich., Metepec I y II, Méx., en donde predominó *Fusarium* sp.

De acuerdo con la literatura, se reporta que las mejores fuentes de resistencia son las provenientes de China, como la línea Chumai 18 (Kohli, 1989; Ireta y Gilchrist, 1994). Pero Dill-Macky (1996) menciona que una línea puede reportar un gran número de fuentes de resistencia bajo condiciones de campo, sin embargo estos niveles pueden romperse cuando las condiciones son altamente favorables para el desarrollo de *F. graminearum* como lo fue en este trabajo. Lo anterior lo confirman también McMullec *et al.* (1997) al reportar que la resistencia puede ser rota cuando las

condiciones ambientales son favorables para *F. graminearum*. Por otra parte, Campbell y Lipps (1998) mencionan que la mayoría de los cultivares presentan resistencia parcial, ya que escapan a la enfermedad o posiblemente se deba a que este patógeno no es constante. Con base a este tipo de comportamiento Parry *et al.* (1995) han concluido que no hay cultivares inmunes, que la mayoría son susceptibles, y sólo unos pocos son moderadamente resistentes. Por lo que Dill-Macky (1996) recomienda que además a las fuentes de resistencia, se tiene que incluir la protección química y prácticas culturales para reducir la presencia del inóculo.

Las inoculaciones de los diez aislamientos sobre los seis genotipos realizadas para observar el grado de patogenicidad, mostraron los resultados que se presentan en el Cuadro 5, los cuales fueron analizados por la prueba de comparación de medias Tukey.

Cuadro 5. Agrupación de medias Tukey al 5% de acuerdo al grado de patogenicidad de los diez aislamientos de *F. graminearum*.

AISLAMIENTO	MEDIA (# espiguillas dañadas / espiga)	AGRUPACION TUKEY
Juchitepec (A1)	4.26	A
Metepec II (A2)	4.23	AB
Metepec I (A3)	4.20	ABC
Bonilla (A4)	4.06	ABC
Jesús María (A5)	4.03	ABC
Cuyuaco (A6)	4.03	ABC
Chapingo (A7)	3.86	BCD
Calpulalpan (A8)	3.73	DC
Potzumarán (A9)	3.70	DC
Tepatitlán (A10)	3.63	D

En el Cuadro 5 se observa que el aislamiento A1 se ubica como el más patogénico y A10 como el menos patogénico, también se observa que A3, A4, A5 y A6 exhibieron el mismo grado de patogenicidad así como A8 y A9 y que a su vez son los aislamientos menos patogénicos junto con A10. Sin embargo, existe traslape en la mayoría de los

aislamientos, lo cual muestra que las diferencias de patogenicidad por regiones son mínimas. Estos resultados son similares a lo reportado por Wang (1996), donde menciona que existe diferencia en los niveles de respuesta de diferentes cultivares de trigo, no así para la agresividad de los aislamientos por región, donde no se encontró diferencia significativa. A su vez Diaz de Ackerman y Kohli (1996) reportan que en un estudio de tres años, la interacción entre cultivar / año fue altamente significativa, mostrando variación en los niveles de infección de un año a otro, no así la interacción aislamientos / cultivares y aislamientos / años las cuales no fueron significativas. Estos resultados confirman estudios anteriores que reportan diferencias significativas para aislamientos de *F. graminearum* por agresividad, más no por virulencia.

4.3. Detección de huellas genómicas de ADN de *F. graminearum*

El protocolo utilizado para la extracción de ADN fue según George *et al.* (1997), ajustado para *F. graminearum*. La estandarización de los componentes de la mezcla de la Reacción en Cadena de la Polimerasa mostró que la concentración donde se obtenían las bandas con mayor nitidez fueron con : 125 ng de ADN, 2.0 mM de MgCl₂, 2U de Taq. Polimerasa, 200 µM de dNTP's, 10X de Amortiguador, 2.0 mM de Iniciador.

La secuencia de los iniciadores con los que se obtuvo amplificación para los aislamientos es la siguiente: ROTH C-01 5'- TTC GAG CCAG - 3'; ROTH C-06 5'- GAA CGG ACTC -3'; ROTH C-12 5'- TGT CAT CCC C -3'; ROTH C-13 5'- AAG CCT CGTC -3'; ROTH C-15 5'- GAC GGA TCAG -3'; ROTH C-16 5'- CAC ACT ACT ACT CCAG -3'; ROTH C-20 5'- ACT TCG CCA C -3'.

Los fragmentos amplificados con los iniciadores anteriormente mencionados del genoma de cada uno de los aislamientos de *F. graminearum*, así como del ADN utilizado como grupo comparador (garbanzo), se muestran en las figuras 5, 6, 7 y 8.

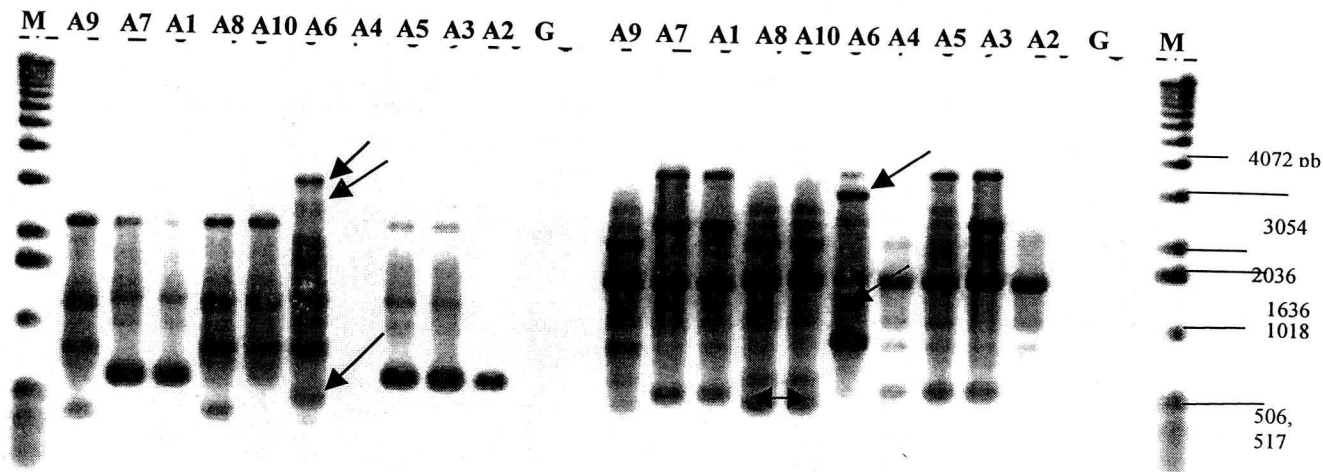


Figura 5. Patrones de ADN detectados con RAPD's con los iniciadores ROTH-C-01 (izquierda) y ROTH-C-06 (derecha) de los aislamientos A9, A7, A1, A8, A10, A6, A4, A5, A3, A2 y G (ADN de garbanzo) y marcador de peso molecular 1 kb. Las flechas señalan bandas polimórficas.

En la Figura 5, el aislamiento A6 presenta tres bandas detectadas con el iniciador ROTH C-01 que no estuvieron presentes en el resto de los aislamientos, dichas bandas presentan un peso aproximado de 3200, 2500 y 506 pb (pares de bases), además no existió amplificación del aislamiento A4 con este iniciador. El aislamiento A6 amplificó con el iniciador ROTH C-06 dos bandas polimórficas de 3054 y 1300 pb, que no se presentan en el resto de los aislamientos; el aislamiento A8 y A10 amplificaron una banda polimórfica de 450 pb con el iniciador ROTH-C-06, que no se observa en el resto de los aislamientos para este iniciador.

En la Figura 6, se observa que el aislamiento A6 presenta tres bandas, con un peso aproximado de 2450, 2036 y 1300 pb que no amplificaron en el resto de los aislamientos

con el iniciador ROTH-C-12; el aislamiento A4 no presenta amplificación con este iniciador. El iniciador ROHT C-13 detectó una mayor cantidad de polimorfismos en todos los aislamientos por ejemplo el aislamiento A4 presenta bandas de un peso aproximado de 2200 y 1636 a 1018 que difieren de los otros, además, se aprecian bandas con bajo peso molecular en los aislamientos A9, A8 y A10.

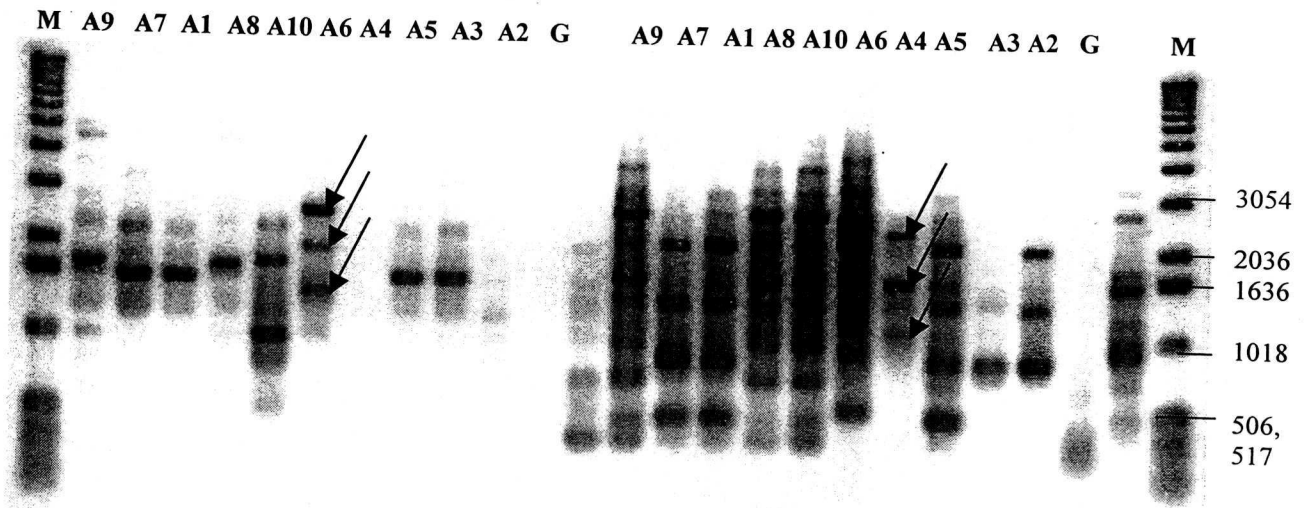


Figura 6. Patrones de ADN detectados con RADP's con los iniciadores ROTH-C-12 (izquierda) y ROTH-C-13 (derecha) de los aislamientos A9, A7, A1, A8, A10, A6, A4, A5, A3, A2 y G (ADN de garbanzo) y marcador de peso molecular 1 kb. Las flechas señalan bandas polimórficas.

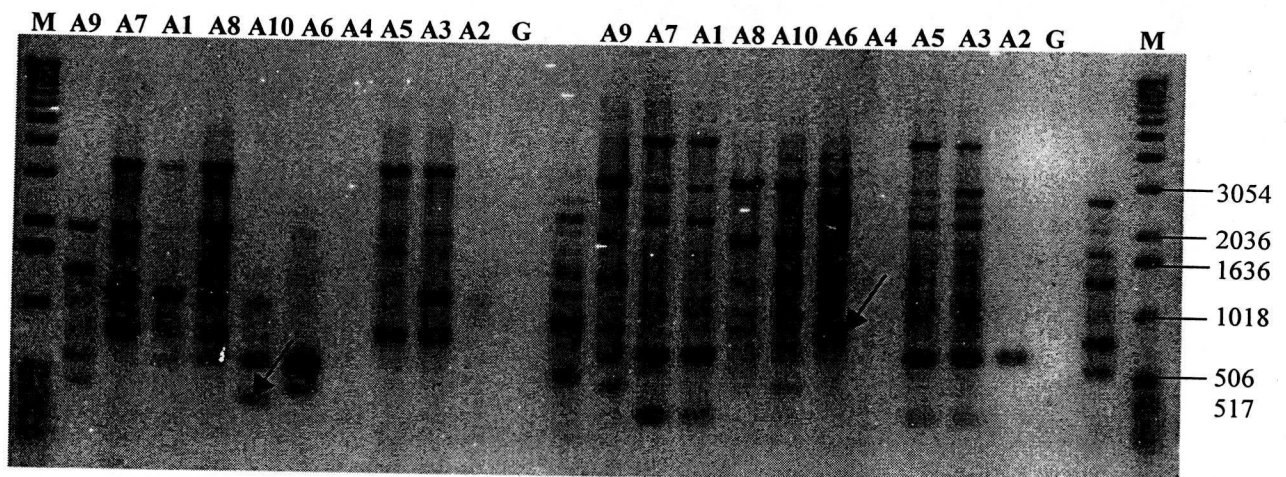


Figura 7. Patrones de ADN detectados con RADP's con los iniciadores ROTH-C-15 (izquierda) y ROTH-C-16 (derecha) de los aislamientos A9, A7, A1, A8, A10, A6, A4, A5, A3, A2 y G (ADN de garbanzo) y marcador de peso molecular 1 kb. Las flechas señalan bandas polimórficas.

El iniciador ROTH C-15, en la Figura 7 observa una banda en el aislamiento A10 de menor peso molecular que no esta presente en el resto de los aislamientos; mientras que con el iniciador ROTH C-16 el aislamiento A6, amplificó una banda de 800 pb que difiere de los demás, el aislamiento A4 no amplificó con ninguno de los dos iniciadores.

La Figura 8, que corresponde a la amplificación para el iniciador ROTH C-20, se observa gran polimorfismo entre los aislamientos; por ejemplo, una banda de aproximadamente 1450 pb para el aislamiento A6 que no repiten el resto; en general las bandas amplificadas con todos los iniciadores utilizados fueron de 3200 a 450 pb y todos detectaron polimorfismo, aunque no en todos los aislamientos, Schillin *et al.* (1994) reportan que obtuvieron polimorfismo en los aislamientos de *F. graminearum* con el iniciador 17 del Kit T obteniendo bandas de 3500 a 250 pb.

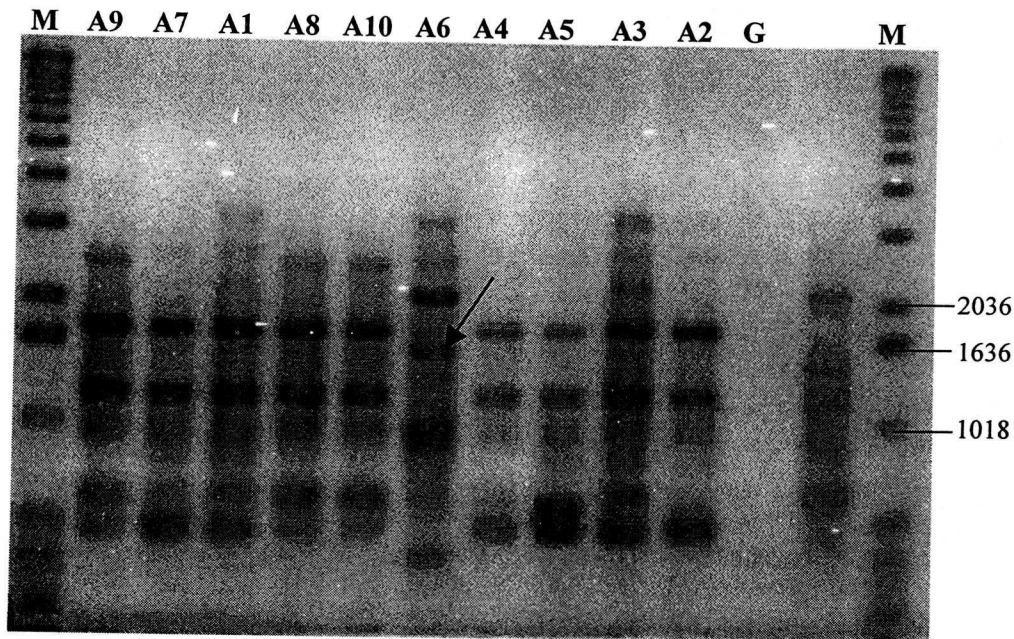


Figura 8. Patrones de ADN detectados con RADP's con el iniciador ROTH-C-20 de los aislamientos A9, A7, A1, A8, A10, A6, A4, A5, A3, A2 y G (ADN de garbanzo) y marcador de peso molecular 1 kb. La flecha señala una banda polimórfica.

4.4. Dendograma de los aislamientos de *F. graminearum*

La matriz binaria de los datos aleatorios de la amplificación de todos los iniciadores con los aislamientos de *F. graminearum* fue analizada por el programa computacional NTSYS, resultando las agrupaciones que se observan en la Figura 9.

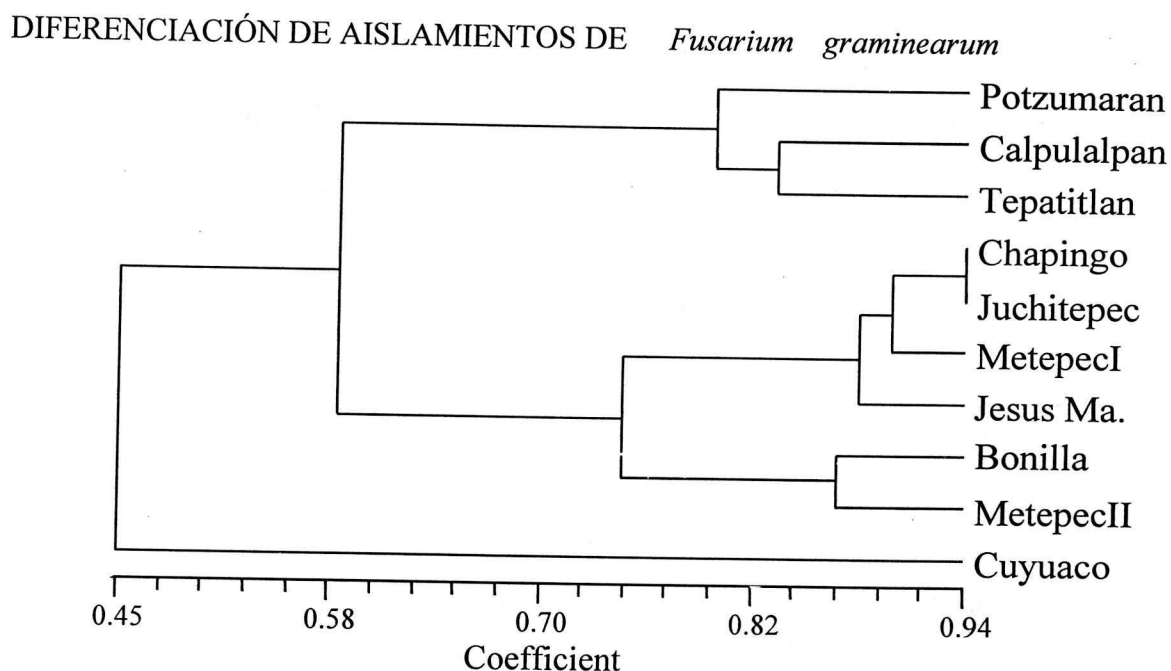


Figura 9. Agrupación de aislamientos de *F. graminearum* de acuerdo a la similaridad de las bandas amplificadas entre aislamientos.

Los nombres que se observan en el margen derecho de la Figura 9, corresponden a los sitios, donde se hicieron, las colectas de la semilla infectada. En el margen inferior se presenta el rango del Coeficiente de Similaridad, donde entre más diferencia exista entre los aislamientos, las barras de los grupos y subgrupos se desplazarán hacia cero, disminuyendo así la similaridad entre ellos.

De acuerdo con Schilling *et al.* (1994) los aislamientos de *F. graminearum* se ubican entre un coeficiente de 0.40 a 0.95 de Coeficiente. En este trabajo se obtuvo un rango de 0.45 a 0.94, lo cual indica que todos los aislamientos están interrelacionados

genéticamente, ya que pertenecen a un mismo género y especie; sin embargo, aún dentro de este Coeficiente de Similitud tan estrecho, se observan tres grupos bien definidos y al aislamiento A6 (Cuyuaco) separado de estos, debido a que éste presenta amplificación de bandas de diferente peso molecular al del resto, ubicándose de manera aislada.

El primer grupo conformado por A9, A8 y A10, presenta bandas de igual peso molecular con el iniciador ROTH C-13, mientras que con el iniciador ROTH C-20 difieren sólo en una, estos aislamientos también comparten algunas bandas con los iniciadores ROTH C-01 y ROTH C-06. A su vez, A8 y A10 también comparten algunas bandas con el iniciador ROTH C-16, debido a esto se encuentran ubicados en un mismo grupo.

En el segundo grupo se tiene que A7 y A1 forman un subgrupo idéntico, ya que comparten bandas de igual peso molecular con casi todos los iniciadores, a excepción del ROTH C-15 y C-20. El aislamiento A3 presenta bandas de igual peso molecular a A7 y A1 con los iniciadores ROTH C-06, C-12 y C-16, por lo que pertenece a un subgrupo muy cercano. El aislamiento A5 es diferente de A3 con los iniciadores ROTH C-13 y C-20. Los aislamientos A4 y A2 fueron los que menos amplificaron; A4 no amplificó con los iniciadores ROTH C-01, C-12, C-15 y C-16, y el aislamiento A2 sólo presenta una banda para los iniciadores ROTH C-01, C-06, C-12, C-15 y C-16.

Los resultados de esta investigación muestran que los aislamientos de *F. graminearum* son muy similares genéticamente; las posibles diferencias que existan en base a regiones geográficas son mínimas, y sugirieron que para analizar alguna variabilidad patogénica es necesario el uso de técnicas moleculares más finas, o posiblemente se lograría observar alguna diferencia utilizando un mayor número de

iniciadores y aislamientos, ya que los RADP's son muy utilizados en *Fusarium* para diferenciar especies. Por ejemplo Nicholson (1996) utilizó un iniciador específico para amplificar la región del gen Tri5 que se le asocia con la producción de micotoxinas que son las que determinan la virulencia de los aislamientos de *Fusarium*, combinándolo con RFLP's para obtener un grupo homólogo de especies de *Fusarium* patogenicas. Así como también Leyva (1998) utilizó la técnica de polimorfismo en los fragmentos de restricción de ADN (RFLP's) para identificar las diferencias de virulencia de aislamientos de *Septoria tritici* en trigo, esta técnica también podría ser utilizada para patogenicidad en aislamientos de *F. graminearum*.

5. CONCLUSIONES

Bajo condiciones naturales de campo los genotipos Gálvez, Pavón y Zacatecas se comportan como susceptibles a *Fusarium graminearum*, mientras que Buc/Alucan, Milán y Chil/Chum 18 se comportan como resistentes, sin embargo el nivel de resistencia de estos últimos se pierde cuando son evaluados bajo invernadero, en condiciones ambientales favorables para el desarrollo de *F. graminearum*.

Los genotipos utilizados muestran resistencia del tipo 1, la cual es la resistencia a la penetración del patógeno.

La variación de patogenicidad de los diez aislamientos es mínima; sin embargo el aislamiento A1 (Juchipepec) se ubica como el más patogénico y el aislamiento A10 (Tepatitlán) como el menos patogénico.

Las condiciones de los componentes de la PCR para *F. graminearum* fueron: 125 ng de ADN, 2.0 mM MgCl₂, 2U Taq. Polimerasa, 200 µM dNTP's, 10X Amortiguador, 2.0 µM Iniciador.

El Kit de iniciadores ROTH "C" muestra siete iniciadores, el 01, 06, 12, 13, 15, 16 y 20 que amplifican secuencias del genoma de *F. graminearum*.

De acuerdo a la similaridad de las bandas amplificadas de los aislamientos, se forman tres grupos inter-relacionados: el grupo 1 formado por Potzumaran, Calpulalpan, Tepatitlan, el grupo 2 por Chapingo, Juchitepec, Metepec I, Jesus Maria, y el grupo 3 por Bonilla y Metepec II, y el aislamiento Cuyuaco, que fue el que mostró más polimorfismo no se ubica dentro de ningún grupo.

Para poder observar el grado de patogenicidad entre aislamientos de *F. graminearum* por PCR es necesario utilizar mayor número de iniciadores y aislamientos, así como otras técnicas moleculares.

6. LITERATURA CITADA

- Achenbach, L. A., J. Patrick and L. Gray. 1996. Use of RAPD markers as a diagnostic tool for the identification of *Fusarium solani* isolates that cause soybean sudden death syndrome. *Plant Disease* 80:1228-1232.
- Agrios, N. G. 1985. Fitopatología. Ed. LIMUSA. 4ta. reimpression. México, D.F. p. 530.
- Ban, T. 1996. Genetic Analysis of Fusarium Head Blight Resistance Using Wheat Doubled Haploids. In: *Fusarium Head Scab: Global Status and Future Prospects*. Dubin H, J., L. Gilchrist, J. Reeves, and A. McNab (eds). México D.F. CIMMYT. pp 71-78.
- Bowden, R. L., and J. F. Leslie. 1996. Diversity and Sexuality in *Gibberella zeae*. In: *Fusarium Head Scab: Global Status and Future Prospects*. Dubin, H. J., L. Gilchrist, J. Reeves, and A. McNab (eds). México D.F. CIMMYT. pp 35-39.
- Bowden, R. L., and J. F. Leslie. 1999. Sexual recombination in *Gibberella zeae*. *Phytopathology* 89:182-188.
- Buerstmayr H., M. Leinmens, H. Grausgruber, and P. Ruckebauer. 1996. Breeding for Scab Resistance in Wheat: Inheritance of Resistance and Possibilities for In Vitro Selection. In: *Fusarium Head Scab: Global Status and Future Prospects*. Dubin H. J., L. Gilchrist, J. Reeves, and A. McNab (eds). México D.F. CIMMYT. pp 52-58.
- Campbell, K. A. G., and P. Lipps E. 1998. Allocation of Resources: Sources of Variation in Fusarium Head Blight Screening Nurseries. *Phytopathology* 88:1078-1086.

- Chen, P., d. Liu, and W. Sun. 1996. New countermeasures of breeding wheat for scab resistance. In: *Fusarium Head Scab: Global Status and Future Prospects*. Dubin, H. J., L. Gilchrist, J. Reeves, and A. McNab (eds). México, D.F. CIMMYT. pp 59-65.
- Chiocchetti, A., S. Ghignone, A. Minuto, M. Gullino L., A. Garibaldi and Q. Migheli. 1999. Identification of *Fusarium oxysporum* f.sp.basilici isolated from soil, basil seed, and plant by RAPD analysis. *Plant Disease* 83:576-581.
- CIMMYT. 1988. Report on wheat improvement 1985-1986. México.
- Desjardins, A. E., R. Proctor H., S. McCormick P., and T. Hohn M. 1996. Reduced Virulence of Trichothecene Antibiotic-Nonproducing Mutants of *Gibberella zeae* in Wheat Field Tets. In: *Fusarium Head Scab: Global Status and Future Prospects*. Dubin H. J., L. Gilchrist, J. Reeves, and A. McNab (eds). México D.F. CIMMYT. pp 29-34.
- Díaz de Ackermann, M., and M. Kohli M. 1996. Research on *Fusarium* Head Blight of Wheat in Uruguay. In: *Fusarium Head Scab: Global Status and Future Prospects*. Dubin, H. J., L. Gilchrist., J. Reeves, and A. McNab (eds). México D.F. CIMMYT. pp 13-18.
- Dill-Macky, R. 1996. *Fusarium* Head Blight: Recent Epidemics and Research Efforts in the Upper Midwest of the United State. In: *Fusarium Head Scab: Global Status and Future Prospects*. Dubin, H. J., L. Gilchrist, J. Reeves, and A. McNab (eds). México D.F. CIMMYT. pp 1-6.
- Doohan, F. M., D. Parry W., P Jenkinson and Nicholson. 1998. The use species-specific Pcr-based assays to analyse *Fusarium* ear blight of wheat. *Plant Pathology* 47:197-205.

- Du Toit L. J., and J. Pataky K. 1999. Reactions of Processing Sweet Corn Hybrids to Gibberella Ear Rot. *Plant Disease* 83: 176-180.
- Galich, M. T. 1989. Importancia y distribución de la fusariosis del trigo en Argentina. In: Taller sobre la fusariosis de la espiga en América del Sur. M. M. Kohli (ed.). México, D.F. CIMMYT. pp 7-26.
- Galich, M. T. 1996. Fusarium Head Blight in Argentina. In: Taller sobre la fusariosis de la espiga en América del Sur. M. M. Kohli (ed.). México, D.F. CIMMYT. pp 19-28.
- George, M. L. C., Nelson, R. J., Zeigler, R. S., and Leung, H. 1998. Rapid population analysis of *Magnapothe grisea* by using rep-PCR and endogenous repetitive DNA sequences. *Phytopathology* 88:223-229.
- Gilbert, G. J., G. Fedak, J. D. Procunier, T. Aung, and a. Tekauz. 1996. Strategies for breeding for resistance to Fusarium head blight in Canadian spring wheat. In: Fusarium Head Scab: Global Status and Future Prospects. Dubin, H. J., L. Gilchrist, J. Reeves, and A. McNab (eds). México D.F. CIMMYT. pp 47-51.
- Gilchrist, L., S. Rajaram., A. Mujeed-Kazi., M. Van Ginkel., H. Vivar., and W. Pfeiffer. 1996. Fusarium Scab Screening Program at CIMMYT. In: Fusarium Head Scab: Global Status and Future Prospects. Dubin, H. J., L. Gilchrist., J. Reeves., and A. McNab (eds). México D.F. CIMMYT. pp 7-12.
- Ireta, M. J., and L. Gilchrist S. 1994. Roña o Tizón de la espiga del Trigo (*Fusarium graminearum* Schwabe). Informe especial de trigo No.20. CIMMYT. México, D.F. 25 p.

- Ireta, M. J. 1986. Estimación de pérdidas en trigo (*Triticum* sp.) causadas por la roña (*Fusarium graminearum* Schw.). Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México.
- Kelly, A., A. R. Alcala J., B. Bainbridge W., J. Heale B., E. Pérez A., and R. M. Jiménez D. 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.
- Kerenyi, Z., E. Taborhegyt, A. Pomazi and L. Hornok. 1997. Variability amongst strains of *Fusarium poae* assessed by vegetative compatibility and RAPD polymorphism. *Plant Pathology* 46:882-889.
- Kohli, M. M. 1989. Análisis de la fusariosis del trigo en el cono Sur. In: Taller sobre la fusariosis de la espiga en América del Sur. M. M. Kohli (ed.). México, D.F. CIMMYT. pp 1-6.
- Lee, S.B., and J. Taylor W. 1990. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press. pp 282-286.
- Leyva, M. S. 1998. Comportamiento de aislamientos de *Septoria tritici* solos y en mezcla, inoculados en diferentes genotipos de trigo harineros (*Triticum aestivum* L.). Tesis de Doctorado. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 86 p.
- McMullen, M., R. Jones and D. Gallenberg. 1997. Scab of Wheat and Barley: A re-emerging Disease of Devastating Impact. *Plant Disease* 81:1340-1348.
- McPherson, J. M., R. Oliver J., and S. Gurr J. 1992. Molecular Plant Pathology. Vol I. Ed. Gurr, J. S., M. McPherson J., and D. Bowles J. Oxford University Press. pp 123-144.

- Mes, J. J., E. Weststeijn A., F. Herlaar, J. Lambalk, J. Wijbrandi, M. A. Haring and B. Cornelissen. 1998. Biological and molecular characterization of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* divides race 1 isolates into separate virulence groups. *Phytopathology* 89:156-160.
- Mesterhazy, A. 1996. Fungicide Control of fusarium Scab and Impact on toxin Contamination. In: *Fusarium Head Scab: Global Status and Future Prospects*. Dubin, H. J., L. Gilchrist, J. Reeves, and A. McNab (eds). México D.F. CIMMYT. pp 120-124.
- Miller, J. D., and H Trenholm L. 1994. *Mycotoxins In Grain*. Ed. Eagan Press. St. Paul, Minesota, USA. pp 3-53.
- Neto N., y N. Giordani A. 1989. Control químico de la fusariosis del trigo. In: *Taller sobre la fusariosis de la espiga en América del Sur*. M. M. Kohli (ed.). México, D.F. CIMMYT. pp 109-118.
- Nicholson, P., F. Doohan, D. Joyce, H.N. Rezanoor, D. Simpson, P.H. Smith, A. Turner, and G. Weston. 1996. Detection and Quantification of Individual Fungal Species in *Fusarium* Ear Blight by PCR. In: *Taller sobre la fusariosis de la espiga en América del Sur*. M. M. Kohli (ed.). México, D.F. CIMMYT. pp:40-46.
- Nicholson, P., D. Simpson, G. Weston, H. N. Rezanoor, A.K. Lees, D.W. Parry and D. Joyce. 1998. Detection and Quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assays. *Plant Pathology* 53:17-37.
- Nyvall, R. F., J. Percich A., and C. Mirocha J. 1999. *Fusarium* head blight of cultivated and natural wild rice (*Zizana palustris*) in Minesota caused by *Fusarium graminearum* and associated *Fusarium* spp. *Plant Disease* 83:159-164.

- Parry, D. W., P. Jenkinson, J. Liggitt, A. Hilton, and J.A. Clement. 1996. Significance and Control of *Fusarium* Ear Blight in Wheat. In: Taller sobre la fusariosis de la espiga en América del Sur. M. M. Kohli (ed.). México, D.F. CIMMYT. pp: 115-119.
- Parry, D. W., P. Jenkinson and L. Mcleod. 1995. *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals-a review. *Plant Pathology* 44:207-238.
- Parry, D. W., and P. Nicholson. 1996. Development of a PCR assay to detect *Fusarium poae* in wheat. *Plant Pathology* 45:383-391.
- Piñeiro M. 1996. *Fusarium* toxins in Uruguayan Wheat. In: *Fusarium Head Scab: Global Status and Future Prospects*. Dubin, H. J., L. Gilchrist, J. Reeves, and A. McNab (eds). México D.F. CIMMYT. pp 125-128.
- Reid, L. M., D. Mather E., and R. Hamilton I. 1996. Distribution of deoxynivalenol in *Fusarium graminearum*-infected maize ears. *Phytopathology* 86:110-114.
- Reis, E. M. 1989. Fusariosis: Biología y epidemiología de *Gibberella zeae* en trigo. In: Taller sobre la fusariosis de la espiga en América del Sur. M. M. Kohli (ed.). México, D.F. CIMMYT. pp 97-102.
- SAGAR. 1997. Anuario estadístico de la producción agrícola de los estados unidos mexicanos. Tomo I. pp 524-529.
- SARH. 1992. Guía fitosanitaria para el cultivo del trigo. Serie Sanidad Vegetal.
- Salas, B., B. Steffenson J., H. Casper H., B. Tacke., T. Fetch G. Jr., and P. Schwars B. 1999. *Fusarium* species pathogenic to barley and their associated mycotoxins. *Plant Disease* 83:667-674.

- Schilling, A. G., E. Moller M., and H. Geiger H. 1994. Modern assays for plant pathogenic fungi (Identificación, Detección and Quantification). Schots, A., F. Dewey M., and R. Oliver P. CAB INTERNACIONAL. pp 47-56.
- Schilling, A. G., E. Moller M., and H. Geiger H. 1996. Polymerase chain reaction-based assays for species-specific detection of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, and *F. avenaceum*. *Phytopathology* 86:515-522.
- Smiley, R. W., and L. Patterson M. 1996. Pathogenic fungi associated with Fusarium foot rot of winter wheat in the semiarid Pacific Northwest. *Plant Disease* 80:944-949.
- Ulloa, M., y R. Hanlin T. 1978. ATLAS DE MICOLOGIA BASICA. Ed. Concepto. México D.F. pp 151-152.
- Vakalounakis, D. J., and G. Fragkiadakis A. 1999. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* aisolates from cucumber: Differentiation by pathogenicity, vegetative compatibility, and RAPD fingerprinting. *Phytopathology* 89:161-168.
- Wang, Y. Z. 1996. Epidemiology and Management of Wheat Scab in China. In: *Fusarium Head Scab: Global Status and Future Prospects*. Dubin, H. J., L. Gilchrist, J. Reeves, and A. McNab (eds). México D.F. CIMMYT. pp 97-105.
- Warham, E. J., L. D. Butler, B.C. Sutton. S.F. Ensayos para la semilla de maíz y de trigo. Manual de laboratorio. CIMMYT. 84 p.

