



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

**CARACTERIZACIÓN DE AISLAMIENTOS DE *Fusarium*
oxysporum f. sp. *ciceri* MEDIANTE PROTEÍNAS
Y PLANTAS DIFERENCIALES**

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

**Maestro en Ciencias en
Protección Vegetal**

Presenta:

GEORGINA MARGARITA BELTRÁN RIOS



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

Chapingo, México. Noviembre de 2003.



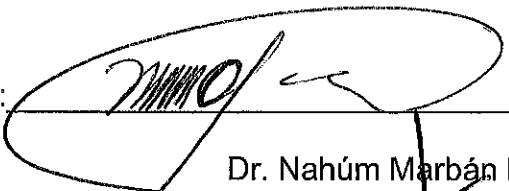
**CARACTERIZACIÓN DE AISLAMIENTOS DE *Fusarium oxysporum*
f. sp. *ciceri* MEDIANTE PROTEÍNAS Y PLANTAS DIFERENCIALES**

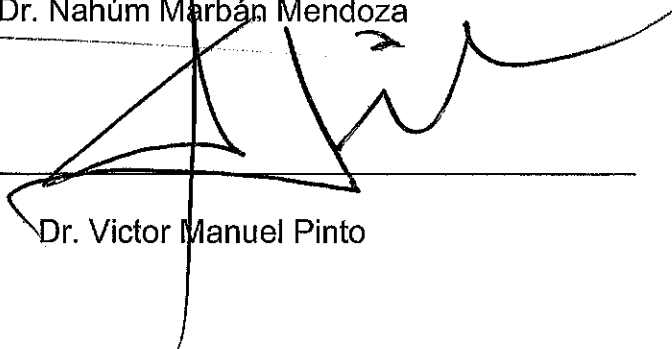
Tesis realizada por Georgina Margarita Beltrán Ríos bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

DIRECTOR: 
Dra. Ernestina Valadez Moctezuma

ASESOR: 
Dra. Hilda Victoria Silva Rojas

ASESOR: 
Dr. Nahúm Marbán Mendoza

ASESOR: 
Dr. Victor Manuel Pinto

AGRADECIMIENTOS

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

A la Universidad Autónoma Chapingo, principalmente al Departamento de Parasitología Agrícola por la orientación y formación académica brindada.

Con admiración y respeto, a la Dra. Ernestina Valadez Moctezuma, por su invaluable ayuda y tiempo dedicado en la dirección de este trabajo. Gracias por su amistad.

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

Con cariño y admiración al Ph. D. Nahúm Marbán Mendoza por sus sugerencias, y por brindarme siempre su apoyo y amistad.

Al Dr. Victor Manuel Pinto por aceptar formar parte de mi comité asesor, su confianza y amistad.

Al Q. F. B. Ricardo Gaspar Hernández, por brindarme siempre su amistad y apoyo en todo momento para la realización de este trabajo.

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

DEDICATORIA

A TI SEÑOR, Por haberme rodeado de estos hermosos Ángeles que me han impulsado a cumplir mis sueños y metas, por estar conmigo en todo momento y por darme fortaleza en los momentos mas difíciles de mi vida.

A MIS PADRES: Por creer en mí y darme la oportunidad de estudiar, por haberme dado la vida, su amor, paciencia, fortaleza, confianza y apoyo incondicional. Gracias por enseñarme a nunca darme por vencida. LOS AMO.

*A MIS HERMANOS: Ana Laura, Ana Luisa y José Manuel
Gracias por brindarme su cariño y ser una parte muy importante de mi vida.*

A MI SOBRINA: Ana Yazmín. Por su amor, ternura y por esos momentos de alegría que me ha brindado.

A MI ESPOSO: Alexander Pérez Miceli. Por ser mi amigo, mi fuente de inspiración y por que su amor es un hermoso regalo que me ha dado la vida. TE AMO.

A MIS AMIGOS: Beatriz Aramburo Medina, Roberto Martínez Suárez y José Gonzalo Díaz Hernández de quienes recibí un apoyo constante y con quienes he compartido tristezas y alegrías por tanto tiempo, gracias por su confianza y por el cariño que siempre me han brindado.

A LA FAMILIA FIGUEROA MATA por permitirme ser parte de sus vidas. Gracias por su amistad y apoyo incondicional. Los quiero mucho.

A mis compañeros y amigos miembros de la Generación 29 de la Maestría en Protección Vegetal. Hilda, Manuel y José Cruz, además de Cesar, Rocha, Arturo y Maribel, por que con su amistad ha hecho mi estancia en Chiapingo una gran experiencia.

A todas aquellas personas que formaron parte de esta aventura y que siempre llevaré en mi corazón.

DATOS BIOGRÁFICOS DEL AUTOR

Georgina Margarita Beltrán Ríos nació el 23 de Abril de 1977, en Culiacán, Sinaloa.

En 1995, ingresó a la Escuela de Biología de la Universidad Autónoma de Sinaloa, de donde egresa obteniendo el Título de Licenciada en Biología en el Área de Ecología en el año 2000.

Su desempeño profesional lo realizó en el Laboratorio de Biotecnología Agrícola del Centro de Ciencias de Sinaloa y como asesor técnico en materia ambiental, realizando tareas de capacitación para el buen uso y manejo de plaguicidas, en el Valle de Culiacán, Sinaloa. AES, S. C.

De agosto de 2001 a julio de 2003, cursó la Maestría en Protección Vegetal del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN	vii
ABSTRACT	vii
1. INTRODUCCIÓN	1
Objetivos	4
Hipótesis	4
2. REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1. El cultivo de Garbanzo	5
2.1.1. Historia	5
2.1.2. Origen y distribución	6
2.1.3. Generalidades botánicas	8
2.1.4. Importancia	11
2.1.5. Fitosanidad del cultivo	12
2.2. La enfermedad llamada rabia del garbanzo	13
2.2.1. El patógeno: <i>Fusarium oxysporum</i> Schl. f. sp <i>ciceri</i> (Padw.) Matuo & Sato	14
2.2.1.1. Antecedentes	14
2.2.1.2. Importancia y distribución	15
2.2.1.3. Epidemiología y ciclo biológico	16

2.2.1.4.	Clasificación taxonómica	18
2.2.1.5.	Síntomas	19
2.2.1.6.	Descripción del patógeno	20
2.2.1.7.	Razas fisiológicas	22
2.2.1.8.	Del control	25
2.3.	Caracterización e identificación	26
2.3.1.	Plantas diferenciales	27
2.3.2.	Marcadores	29
2.3.2.1.	Marcadores morfológicos	30
2.3.2.2.	Marcadores genéticos	31
2.3.2.3.	Marcadores bioquímicos	32
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	35
3.1.	Fase de Laboratorio	35
3.1.1.	Origen de las cepas utilizadas	35
3.1.2.	Activación de aislamientos monospóricos	35
3.1.3.	Purificación de las cepas	36
3.1.4.	Extracción de proteínas.....	37
3.1.5.	Cuantificación de proteínas	39
3.1.6.	Preparación de la muestra de proteínas	40
3.1.7.	Preparación de geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	41
3.1.8.	Corrimiento de las muestras de proteínas (SDS-PAGE) ...	41
3.1.9.	Tinción y desteñido de los geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	42

3.1.10. Documentación y análisis de los geles (SDS-PAGE)	42
3.2. Fase de invernadero	42
3.2.1. Plantas diferenciales evaluadas a los diferentes grupos de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceri</i>	43
3.2.2. Siembra en invernadero	45
3.2.3. Preparación del inóculo	46
3.2.3.1. Inoculación del patógeno	47
3.2.5. Evaluación de la respuesta en invernadero en las variedades diferenciales de garbanzo a diferentes grupos de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceri</i>	47
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
4.1. Características morfológicas	49
4.2. Extracción y cuantificación de proteínas	49
4.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida	50
4.4. Análisis de los resultados obtenidos de la electroforesis	51
4.5. Análisis estadístico del dendrograma	52
4.6. Reacción de las variedades de garbanzo a la inoculación de los aislamientos de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceri</i>	56
5. CONCLUSIONES	59
6. LITERATURA CITADA	60
7. APÉNDICE	75

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Variedades diferenciales de garbanzo y sus reacciones a razas de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceri</i>	28
Cuadro 2. Aislamientos monospóricos de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceri</i> considerados para la extracción de proteínas totales	37
Cuadro 3. Soluciones utilizadas en la cuantificación de proteínas totales por el método de Lowry	40
Cuadro 4. Aislamientos de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceri</i> seleccionados por grupos y utilizados en la inoculación de plantas diferenciales de garbanzo	43
Cuadro 5. Resultado de la inoculación de los aislamientos de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceri</i> a las diferentes variedades de garbanzo	56

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Principales países productores de garbanzo	7
Figura 2. Características morfológicas de la flor de garbanzo	9
Figura 3. Vainas de Garbanzo	10
Figura 4. Características morfológicas de <i>Fusarium oxysporum</i> . A) macroconidios con septas, B) microconidios unicelulares, C) Microconidioforos, D) Clamidosporas	22
Figura 5. Síntomas de amarillamiento y marchitez causados por <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceri</i> en plantas de Garbanzo	24
Figura 6. Semillas representantes de cultivares de plantas diferenciales utilizadas en esta investigación	29
Figura 7. Origen de las cepas de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceri</i> causantes de síntomas de amarillamiento y marchitez en plantas de garbanzo de la zona del Bajío, México	36
Figura 8. Aislamientos de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceri</i> en medio Czapek .	37
Figura 9. Diseño de las plantas de garbanzo en el invernadero	44
Figura 10. Desinfestación de las semillas de garbanzo	45
Figura 11. Plántulas de las 8 variedades diferenciales de garbanzo utilizadas en la presente investigación	46

- Figura 12.** Geles de poliacrilamida que muestran los perfiles de proteínas totales de los aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* correspondientes a las muestras 32B, 35, 36, 37, 38, 41, 42, 43. Los carriles de los extremos de cada gel marcados con M corresponden al marcador de peso molecular Benchmark®. Las flechas indican algunas de las bandas polimórficas consideradas en el análisis de similitud. 50
- Figura 13.** Relación fenotípica en base al análisis de proteínas totales de 52 aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* procedentes de la zona del Bajío 51

CARACTERIZACIÓN DE AISLAMIENTOS DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* MEDIANTE PROTEÍNAS Y PLANTAS DIFERENCIALES

CHARACTERIZATION OF ISOLATIONS OF *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* BY MEANS OF PROTEINS AND DIFFERENTIAL PLANTS

Georgina M. Beltrán Ríos¹ y Ernestina Valadez Moctezuma²

RESUMEN

El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) es fuertemente atacado por organismos habitantes del suelo; entre éstos tenemos a los hongos, quienes inducen síntomas de amarillamiento, marchitez y muerte de las plantas. *Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. *ciceri* (Padw.) Matuo & Sato es el principal hongo causante de la "rabia" o marchitez del garbanzo, la cual es considerada como la enfermedad más importante de este cultivo. Este fitopatógeno ocasiona pérdidas anuales que fluctúan entre un 10 y 15%, aunque en años de epidemia severa se pueden incrementar de 60 a 70%. El objetivo del presente estudio fue caracterizar mediante patrones de proteínas totales a diferentes aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* provenientes de los Estados de Guanajuato y Michoacán, así como tratar de identificar las posibles razas a las cuales pertenecían dichos aislamientos, mediante la reacción de ocho genotipos diferenciales de garbanzo. Las proteínas totales se obtuvieron de cultivos monosporicos y la separación de éstas por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio. Posteriormente los ocho genotipos de garbanzo, se inocularon con representantes de los diferentes grupos del hongo. Los resultados permitieron suponer que existen las razas 3, 4 y 5 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* en la región garbancera del Bajío, México.

Palabras clave: *Cicer arietinum* L., *Fusarium oxysporum*, electroforesis, genotipos diferenciales.

ABSTRACT

Chick-pea (*Cicer arietinum* L.) is severely affected by soil borne fungi such as *Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. *ciceri* (Padw.) Matuo & Sato that induce yellowing, wilting and death to affected chick-pea plants. This is known as "rabies disease" by local growers. This disease causes annual losses between 10-15%, although during the years of severe epidemics losses might be up to 60-70%. The main objective of this contribution was to characterize by means of total protein patterns different isolations from Guanajuato and Michoacan States, the major chick-pea growing area in Mexico. Another objective was to identify strains through eight differential genotypes of chick-pea. The total proteins were obtained from monosporic cultures and the chemical separation was obtained by electrophoresis in polyacrilamid gels with sodium dodecylsulphato. Subsequently, the eight genotypes of chick-pea were individually inoculated with each fungi isolation group. The results allowed us to assume that there are at least three strains (3,4 and 5) of *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* in the area studied.

Key words: *Cicer arietinum* L., *Fusarium oxysporum*, electrophoresis, differentials genotypes.

¹Alumna del Programa de Maestría en Ciencias en Protección Vegetal. Chapingo, Méx. e-mail: gema03@yahoo.com
²Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Méx. e-mail: evaladez@taurus1.chapingo.mx

1. INTRODUCCIÓN

El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) es una de las leguminosas más importantes a nivel mundial pues posee un alto valor nutritivo. Contiene entre un 18 y 26% de proteína bruta, por su composición en aminoácidos está entre las leguminosas de mejor calidad (De Miguel, 1991).

Ésta como otras leguminosas son fuertemente atacadas por organismos habitantes del suelo; por ejemplo los hongos, que inducen síntomas de amarillamiento, marchitez y muerte de las plantas atacadas (Haware, 1998).

Fusarium oxysporum Schl. f. sp. *ciceri* (Padw.) Matuo & Sato es el hongo principal entre otros, causante de la enfermedad llamada "rabia" o marchitez del garbanzo, que es considerada como la enfermedad más importante de este cultivo. Este fitopatógeno ocasiona pérdidas anuales que fluctúan entre un 10 y 15%, aunque en años de epidemia severa se pueden incrementar a 60-70% (Bhushan y Chand, 1992).

El hongo posee una gran variabilidad genética y patogénica, reconociéndose ocho razas fisiológicas en base a su reacción en plantas diferenciales de garbanzo (0, 1A, 1B/C, 2, 3, 4, 5 y 6). Las razas 1, 2, 3 y 4 se describieron por primera vez en la India por Haware y Nene (1982); las razas 0 y 5 en España por Jiménez-Díaz *et al.*, (1989) y la raza 6 en California por Phillips (1988). Los aislamientos de la raza 1 se han dividido en subgrupos (1A, 1B y 1C) en California y España en función del patotipo mostrado (Kelly y Alcalá-Jiménez, 1994).

El desarrollo de la Fusariosis vascular del garbanzo está influenciado por varios factores ambientales como temperatura del suelo, actividad microbiana, densidad de inóculo, razas del patógeno prevalentes, densidad de siembra y susceptibilidad de la planta (Jiménez-Díaz, 1994; Haware, 1998).

Esta enfermedad ha sido reportada en casi todos los países productores de garbanzo, entre los que sobresalen Etiopía, México, Siria, Turquía, Chile, Irán, Sudán, Estados Unidos, Perú y Malawi (Bhushan y Chand, 1992).

En México no se conocen con exactitud las razas existentes de *F. oxysporum* f. sp. *ciceri*, por lo que es necesario realizar trabajos enfocados a su identificación, caracterización y distribución, para que de esta manera se puedan enfocar los esfuerzos de control y manejo del patógeno con base a las variantes fisiológicas existentes.

En México se han realizado algunos trabajos enfocados a identificar con marcadores de ADN y proteínas totales, la variabilidad genética y razas de este hongo. Se han estudiado previamente aislamientos del hongo en diferentes zonas productoras de garbanzo en los Estados de Guanajuato y Michoacán (Perales, 2000; Pérez, 2000; Cámara, 2001; Luna 2002). Perales (2000) caracterizó 24 de 52 aislamientos mediante patrones electroforéticos de proteínas, en donde se visualizó la conformación de tres grupos diferentes. La posibilidad de diferenciar razas de esta manera ha sido exitosa; ya que, Suseelendra *et al.* (1992) en la India, separó cuatro razas de este hongo utilizando patrones electroforéticos de proteínas totales.

Solís (1999) inoculó cepas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* en plantas diferenciales, con lo cual pudo detectar las razas 3 y 4 en base al protocolo propuesto por Haware y Nene (1982); sin embargo la gran mayoría de los aislamientos no pudieron ser agrupados, ya que la respuesta de las plantas diferenciales fue heterogénea (Cámara, 2001).

De acuerdo a lo anterior y con fines de caracterizar los 52 aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* obtenidos de los Estados de Guanajuato y Michoacán existentes en el laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Fitotecnia, se planteó la presente investigación con los objetivos siguientes:

- 1) Diferenciar mediante patrones electroforéticos de proteínas totales 52 aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* procedentes de los Estados de Guanajuato y Michoacán.
- 2) Correlacionar los diferentes agrupamientos fenotípicos como posibles razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* con base a su reacción en genotipos diferenciales de *Cicer arietinum* L.

Hipótesis

El hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* presenta variabilidad genética en la zona garbancera del Bajío y es posible identificar grupos causantes de síntomas particulares mediante patrones electroforéticos de proteínas totales y plantas diferenciales.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. El cultivo de Garbanzo

2.1.1. Historia

El nombre *Cicer* tiene origen latino y probablemente derive de la palabra pre-indogermánica *Kickere* utilizada por las tribus antiguas que habitaban en el norte de Grecia. La referencia más antigua de la palabra *arietinum* se encuentra en un trabajo de Columella, seguramente como traducción del griego *krios*, que significa carnero y garbanzo y que alude a la forma de la semilla, parecida a la cabeza de un carnero (De Miguel, 1991).

El cultivo se remonta a más de 7 000 años en el oeste de Asia, habiéndose encontrado restos arqueológicos que datan de hace 10 000 años en Turquía (Van Der Maesen, 1987).

En Egipto, Roma y en la antigua Grecia, el garbanzo y en general todas las leguminosas de grano, servían de alimento a la clase más pobre. Los sacerdotes y estudiantes eran advertidos del peligro de comerlos, ya que se creía que podrían inhibir la claridad de pensamiento y disminuir la riqueza espiritual. Tampoco pasó desapercibida la forma en que semejaba la semilla aun testículo, lo que sugería un efecto afrodisíaco (De Miguel, 1991).

2.1.2. Origen y distribución

Vavilov (1951) menciona que el garbanzo tiene dos centros de origen primario, el Suroeste de Asia y la Cuenca del Mediterráneo y uno secundario que es Etiopía, ya que observó que los cultivares con semillas grandes abundaban alrededor de la Cuenca, mientras los de semilla pequeña predominaban en el Este.

De Miguel (1991) señala que el garbanzo es un cultivo probablemente originario de la zona Suroeste de Turquía que limita con Siria, tomando en cuenta que en esta región se han encontrado tres especies silvestres muy relacionadas con la especie cultivada: *Cicer bijugum* K. H. Reach, *Cicer echinospermum* P. H. Davis y *Cicer reticulatum* Lad. (esta última es considerada como subespecie o variedad silvestre de *Cicer arietinum* L.).

Sin embargo otros botánicos han postulado diversos orígenes para el garbanzo. Se menciona que su origen se encuentra en un área comprendida entre el Norte de Persia y el Sur del Cáucaso (De Candolle, 1883), mientras que otros autores consideran que se originó en el Mediterráneo Oriental, Noroeste de África y Suroeste de Asia (Aykroyd y Doughty, 1982) y que las variedades blancas de grano grande, provienen de la región mediterránea de Europa, mientras que el porquero de grano chico, de los países asiáticos (Coronel, 1980).

El garbanzo se cultiva ampliamente en una franja de la región mediterránea, hasta las zonas tropicales y subtropicales del Cercano Oriente y Asia. La India y Pakistán representan el 85% de la superficie mundial dedicada a este cultivo¹.

En la India el primer reporte data del año 2000 a. C., y se distribuyó a su vez por Egipto, Grecia, Roma y La Península Ibérica. En el siglo XVI, los españoles y portugueses lo introdujeron en América Central y Sudamérica, donde encontró condiciones favorables para su rápida expansión, sobre todo en México y en el Sur de los Estados Unidos (De Miguel, 1991).

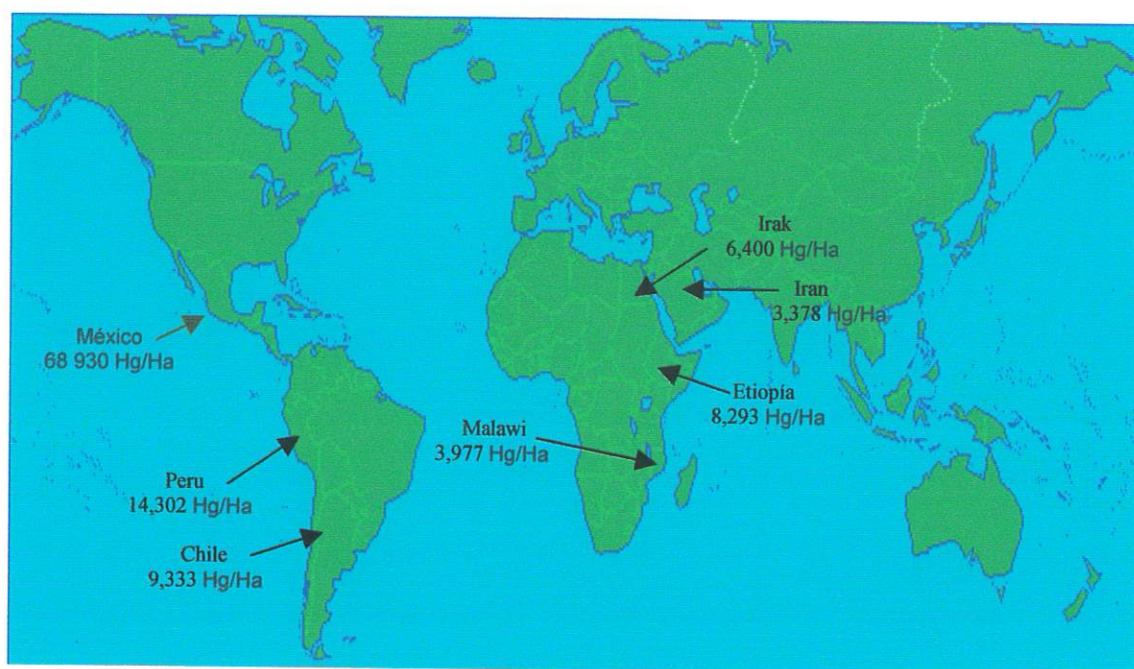


Figura 1. Principales países productores de garbanzo (FAO, 2002²).

¹ <http://www.qro.itesm.mx/agronomia2/extensivos/CGarbanzoGeneralidades.html>

² <http://www.fao.org>.

La introducción del garbanzo en el continente americano se atribuye a Cristóbal Colón en su segundo viaje a América, encontrando condiciones ambientales favorables para su rápida distribución, principalmente en México y sur de los Estados Unidos (Coronel, 1980 y Perales, 2000).

2.1.3. Generalidades botánicas

Van Der Maesen (1972), cita que el garbanzo pertenece a la División: Spermatophyta, Clase: Dicotiledoneae, Orden: Fabales, Familia: Fabaceae, Subfamilia: Papilionoideae, Tribu: Ciceraceae, Género: *Cicer*, Especie: *Cicer arietinum* L.

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

desiguales (Figura 2) y 10 estambres de los cuales 9 están soldados (Coronel, 1980; Ustimenko, 1982; Andrade, 1989 y De Miguel, 1991).

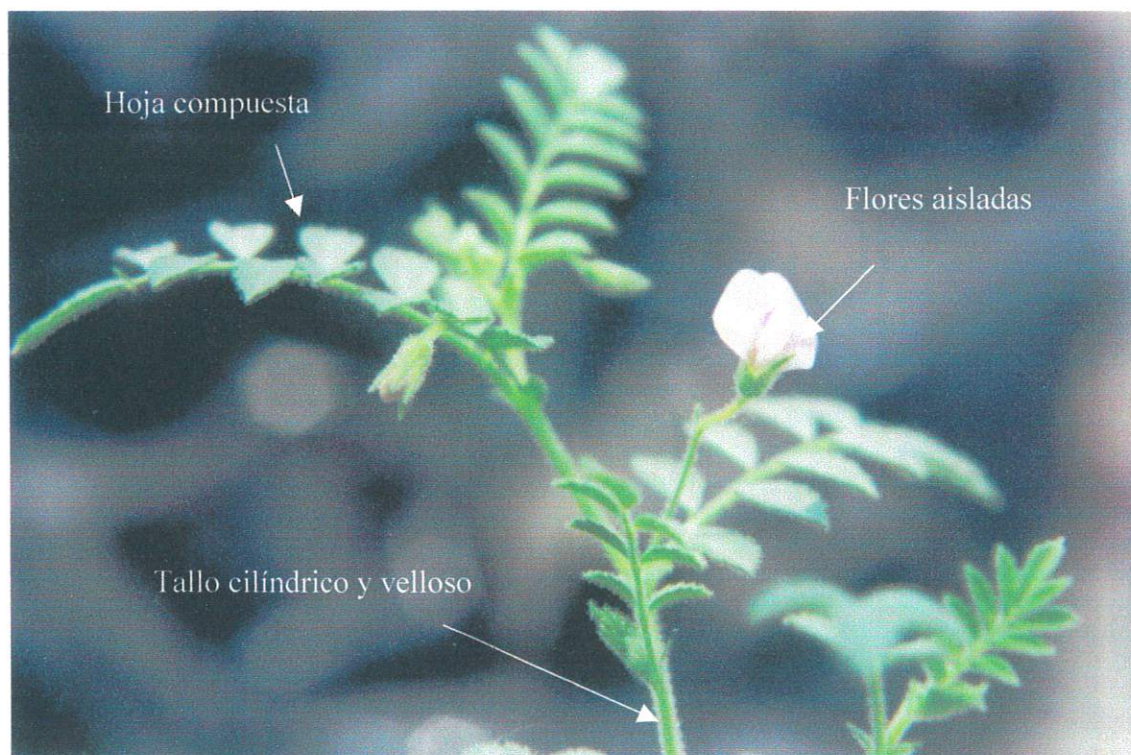


Figura 2. Características morfológicas de la flor de garbanzo.

El fruto se presenta en vainas, inflados, pubescentes y contienen de 1 ó 2 semillas (Figura 3). Las semillas comúnmente son globosas y ligeramente aplastadas y lobuladas por un lado. Los colores de la semilla varían según la variedad, los hay blanco, mate, crema, marrón, rojizo y negro. El tamaño es variable; las semillas grandes pesan 0.5 gramos o más y las pequeñas 0.15 gramos o menos, encontrándose también tamaños intermedios (Crispín y López, 1976).



Figura 3. Vainas de Garbanzo.

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

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

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

2.1.4. Importancia

El garbanzo es una de las leguminosas de grano más importantes a nivel mundial después del frijol, esto se deriva de que posee alto valor nutritivo. Contiene entre 18 y 26% de proteína bruta (dentro de las leguminosas es la de mejor calidad por su composición en aminoácidos), superando en contenido proteico al huevo y a la leche y acercándose a la carne de res; además, contiene vitaminas del complejo B (De Miguel, 1991; ASERCA, 1997; Haware, 1998 y Microsoft, 2001) y casi tan ricos en glúcidos como los cereales, que junto con ellos, son los alimentos más pobres en agua y son los más ricos en fibra. Constituyen un alimento muy valioso desde el punto de vista nutrimental³.

Esta leguminosa se cultiva en invierno en la India, Etiopía y Sudamérica y en primavera en la región del Mediterráneo (De Miguel, 1991). Al practicarse como cultivo de invierno, no interfiere con otros cultivos importantes de verano o primavera, lo que permite además lograr una rotación con cereales; y como puede completar su ciclo vegetativo y producir cosecha aún en condiciones de escasa humedad en el suelo, su costo de producción es bajo, comparado con el de otros cultivos (Crispín y López, 1976).

³ <http://geocities.com/NapaValley/Vineyard/9473/garbiolo.html>

En México se cultivan dos tipos de garbanzo (Desi y Kabuli) en regiones bien definidas. La región del Bajío, que incluye a los Estados de Guanajuato, San Luis Potosí, Querétaro, Michoacán y Jalisco, produce el 90% del garbanzo tipo Desi (marrón) denominado localmente “porquero o forrajero” y sólo un 10% de su superficie se destina a la producción del garbanzo tipo Kabuli (blanco). En el Noroeste del País (Sonora, Baja California Sur y Sinaloa) se cultiva el garbanzo blanco o de uso comestible, destinado en un 90% al mercado de exportación (SAGAR, 2001).

2.1.5. Fitosanidad del cultivo

Uno de los factores limitantes en la producción de este cultivo a nivel mundial son las enfermedades. Se han reportado 67 especies de hongos, 3 de bacterias, 22 de virus y 80 de nematodos relacionados con el garbanzo; sin embargo no todos causan daños de importancia económica (Nene *et al.*, 1996; citado por Haware, 1998).

A nivel nacional los problemas fitosanitarios son ocasionados por plagas, malezas y enfermedades, responsables de enormes pérdidas en la producción. Las plagas de mayor importancia en nuestro país son; Gusanos trozadores (*Agrotis ipsilon* Hufnagel y *Feltia subterranea* Fabricius), minadores de la hoja (*Lyriomiza* sp. Blanchard), gusano soldado (*Spodoptera exigua* Hubner) y gusano bellotero (*Heliothis virescens* Fabriciusy *Heliothis zea* Boddie). Las principales malezas presentes en este cultivo son: zacate Johson (*Sorghum halepense* L.), verdolaga (*Portulaca oleraceae* L.), zacate pinto (*Echinochloa*

colonom L.), bledo o quelite (*Amaranthus* spp. L.) y lengua de vaca (*Rumex crispus* L.) las cuales compiten con el cultivo por luz, agua y nutrimentos, siendo también algunas de ellas portadoras asintomáticas de la Fusariosis vascular (Mateos, 1996 y Gómez, *et al.*, 1997).

Entre las enfermedades que atacan al garbanzo las más importantes son: roya o chahuixtle (*Uromyces ciceriarietini* Jaez), el moho blanco (*Sclerotinia esclerotiorum* De Bary), moho gris (*Botritis cinerea* Pers.), mildiú (*Peronospora* sp. Corda) y la rabia del garbanzo, cuyo agente causal es un complejo de hongos (INIFAP, 1998).

2.2. La enfermedad llamada rabia del garbanzo

Esta enfermedad se encuentra distribuída en los países productores de garbanzo, entre los que sobresalen Etiopía, México, Siria, Turquía, Chile, Irán, Sudán, Estados Unidos, Perú y Malawi. Causando mayores daños en la India, Irán, Pakistán, Nepal, Birmania, España y Turquía (Trapero-Casas y Jiménez-Díaz, 1985; Bhushan y Chand, 1992 y Jiménez-Díaz *et al.*, 1993;). La rabia es la responsable de la inestabilidad de la producción en todas las áreas del mundo donde se siembra garbanzo, por lo que es estudiada en forma intensiva en casi todos los lugares donde se hace investigación sobre este cultivo (ICRISAT/ICARDA, 1990 y Saxena *et al.*, 1996).

Los hongos asociados a este complejo son *Fusarium solani* (Mart. Apple End Wr), *Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. *ciceri* (Padw.) Matuo & Sato, *Rhizoctonia solani* Kühn, *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid y *Sclerotium rolfsii* Sacc. (Díaz *et al.*, 1996; Mateos, 1996 y Gómez *et al.*, 1998).

De este complejo, el género *Fusarium* es considerado el más importante por su distribución y patogenicidad, ya que causa la muerte de plantas en todo el ciclo vegetativo (Gómez y Paredes, 1984 y Gómez *et al.*, 1998).

2.2.1. El patógeno: *Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. *ciceri* (Padw.) Matuo & Sato

2.2.1.1. Antecedentes

El primer reporte de marchitamiento del garbanzo ocasionado por *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* fue en la India por Butler en 1918. McKerral (1923) consideró que la enfermedad se encontraba en el suelo. Mientras que Narsimhan (1929) y Dastur (1935) reportaron que *Fusarium* spp. se encontraba asociado con *Macrophomina phaseolina*, ocasionando el marchitamiento de las plantas.

Dastur (1935) al no poder comprobar la patogenicidad de aislamientos de *Fusarium* sp. concluyó que la marchitez era ocasionada por factores abióticos.

Prasad y Padwick (1939) reportaron como agente causal de la marchitez del garbanzo a *Fusarium* sp., y en 1940 Padwick lo llamó *F. orthoceras* Apeen & Wollenw var. *ciceris*. Pero en 1958 Erwin lo renombró como *F. lateritium* (Nees) Snyder y Hansen f. sp. *ciceri* (Padw) Erwin. Chattopadhyar y Sen Gupta (1967) renombraron al patógeno como *Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. *ciceris* (Padw.) Snyder & Hansen, siendo su nombre actual; sin embargo Booth en 1971 lo nombró como *Fusarium oxysporum* Schl. f. sp *ciceri* (Padw.) Matuo & Sato como se le conoce actualmente.

2.2.1.2. Importancia y distribución

F. oxysporum, es un hongo cosmopolita responsable de la pudrición y marchitez de un gran número de plantas, debido a que bloquea el sistema vascular, impidiendo de esta forma el movimiento de agua en las raíces. Existen más de 150 formas patogénicas (Baayen *et al.*, 2000), parasitando más de 100 especies de plantas económicamente importantes; esto, gracias a los diversos mecanismos que tiene el hongo para vencer las defensas de las plantas con diferente grado de resistencia (Bosland, 1998; Kistler *et al.*, 1998; De Cal *et al.*, 200 y Migheli *et al.*, 2000).

Este hongo ocasiona pérdidas anuales de 10-15%, aunque en años de epidemia severa se puede incrementar de 60 a 70%. También se reportan daños superiores a 61% en estado de plántula y de 43% en estado de floración (Neman y Karen, 1973), sumando a esto los amarillamientos tardíos, que

reducen el número de semillas por planta. Las semillas cosechadas de plantas enfermas son ligeras y arrugadas, lo que ocasiona pérdidas desde un 10% hasta un 100% (Bhushan y Chand, 1992).

2.2.1.3. Epidemiología y ciclo biológico

El desarrollo de la rabia del garbanzo está influenciada por factores ambientales como la temperatura del suelo, actividad microbiana, densidad del inóculo, razas del patógeno, densidad de siembra y susceptibilidad de la planta. Esta enfermedad es importante entre los 30° latitud Norte y 30° latitud Sur, sobre todo en regiones cálidas y húmedas (Jiménez-Díaz, 1994 y Haware, 1998).

F. oxysporum inverna en el suelo en forma de micelio y en cualquiera de sus formas conidiales, pero lo hace con mayor frecuencia por clamidosporas en los restos de vegetales y puede persistir como saprófito por más de 10 años en ausencia de hospedantes susceptibles; se encuentra también en el hilum de la semilla en forma de clamidospora, las cuales juegan un papel muy importante en la dispersión y transmisión de la enfermedad a nuevas áreas; en semilla puede sobrevivir más de 2 años. Se disemina a cortas distancias mediante el salpique por el agua de lluvia, a través del riego, equipo agrícola contaminado; y a grandes distancias la transmisión se realiza mediante semilla y propágulos infectados. Una vez que el inóculo se ha establecido en el suelo es muy difícil su erradicación (Blancard *et al.*, 1991; Romero, 1993 y Agrios, 1996).

En plantas sanas que crecen en un suelo contaminado, se infectan por heridas causadas por daños mecánicos por implementos de labranza o por el crecimiento de raíces secundarias; los tubos germinativos de los conidios o el micelio penetran directamente a la planta a través de los pelos radicales. El micelio invade la región vascular propagándose intercelularmente, donde produce microconidios que son transportados en sentido ascendente hacia el tallo y la corona de la planta. Produce sustancias que degradan tejidos y colapsan las células del hospedante; provocan decoloración marrón y taponamiento de vasos del sistema vascular, existiendo déficit hídrico, lo cual induce marchitez y posteriormente muerte de la planta (Agrios, 1996 y Cruz *et al.*, 1998).

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

Las enzimas producidas por el hongo (poligalacturonosas, peptato-lisasas, hemicelulasas y celulasas) degradan la pared celular desempeñando un papel importante en la penetración y colonización de los tejidos vegetales (Jiménez, 1996). Las enzimas pectolíticas destruyen la lámina del parénquima del xilema promoviendo la formación de tilosa que reducen el paso de fluidos a través de los vasos (Goodman *et al.*, 1986).

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

La temperatura óptima para el desarrollo de *F. oxysporum* es de alrededor de 26° C, pero los síntomas se manifiestan a temperaturas más altas, en periodos de baja humedad relativa y fuerte luminosidad. El hongo es favorecido por suelos con alto contenido de materia orgánica, así como en aquellos en donde existen poblaciones de nemátodos agalladores, ya que estos favorecen la penetración del hongo al causar heridas en las plantas (Caperton *et al.*, 1986 y Blancard *et al.*, 1991).

2.2.1.4. Clasificación taxonómica

Aunque la situación taxonómica de las especies de *Fusarium* aún no está clara (Chelkowski, 1989), *F. oxysporum* pertenece al grupo de los hongos imperfectos o Deuteromycetes, denominados así por que raras veces o nunca se reproducen sexualmente. Sin embargo, hay micólogos que no están de acuerdo con esta denominación porque bajo ciertas condiciones ambientales y de nutrición, se ha logrado que algunos hongos se reproduzcan sexualmente (Romero, 1993).

Los hongos imperfectos son agrupados por conveniencia dentro de la división Deuteromycotina, ya que los caracteres empleados en la sistemática se refieren a la reproducción (Ainsworth, 1973).

Alexopoulos y Mims (1979), clasifican a *F. oxysporum* dentro del reino Mycetae ubicándolo en la división: Amastigomycota, subdivisión: Eumycotina, clase: Deuteromycetes, orden: Moniliales, familia: Moniliaceae, género: *Fusarium*.

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

Kendrick (2000), ubica al patógeno *F. oxysporum* Schl. f. sp *ciceri* de la siguiente manera: Phylum: Dikaryomycota, Subphylum: Ascomycotina, Clase: Ascomycetes, Orden: Hypocreales, Familia: Nectriaceae, Género: Nectria, Especie: *Fusarium oxysporum*.

2.2.1.5. Síntomas

La rabia del garbanzo presenta dos síntomas: la marchitez y el amarillamiento que se distinguen entre sí por cambios que se observan en la planta y la rapidez con que se desarrollan (Cabrera de la Colina *et al.*, 1988).

Cuando las plantas son afectadas en etapa de plántula por *F. oxysporum*, es posible que éstas se marchiten y mueran poco después de que aparezcan los primeros síntomas. En plantas adultas ocasiona pudrición de raíces, tallos y frutos. El ataque comienza bajo el nivel del suelo como una pudrición suave y oscura de cuello y raíz, induciendo marchitamiento en la planta a causa de la obstrucción del sistema de conducción. El hongo crece a través del cortex de la zona invadida hasta alcanzar el xilema, donde ejerce la patogénesis (Jiménez-Díaz, 1994).

2.2.1.6. Descripción del patógeno

Se caracteriza por producir colonias de rápido crecimiento, con una tasa diaria cercana a un centímetro en medio Papa-Dextrosa Agar (PDA) a 26° C y pH de 6. La morfología de las colonias es muy variable y puede presentar dos tipos; una de tipo micelial caracterizada por la producción de abundante micelio aéreo, algodonoso y de coloración variable de blanco a rosado-durazno, pero usualmente con un tinte púrpura o violeta más intenso en la superficie del agar y pocas microconidias (Booth, 1971). La otra forma del micelio es de tipo pionotal con la formación de poco o ningún micelio aéreo y abundantes microconidias. Raramente produce esporodoquios, pero cuando los presentan son cubiertos totalmente por el micelio (Bhushan y Chand, 1992; Ahmed y Reddy, 1993 y Haware, 1998).

El hongo produce principalmente dos clases de estructuras propagativas: 1) microconidias que son conidios unicelulares, sin septas, hialinas, elipsoidales a cilíndricas, rectas o curvadas; se forman sobre fiálides laterales, cortas, simples o sobre conidióforos poco ramificados. Estas estructuras tienen 5-12 micras de largo por 2.5-3.5 micras de ancho; 2) las macroconidias presentan paredes delgadas, hialinas, fusiformes, largas, moderadamente curvadas en forma de hoz, con varias células y de 3 a 5 septas transversales, con la célula basal elongada y la célula apical atenuada; las macroconidias miden de 27 a 46 micras de largo por 3.0 a 4.5 micras de ancho; además de estructuras de conservación llamadas clamidosporas, que son esporas formadas a partir de la condensación del contenido de las hifas y de las conidias, de paredes gruesas (Figura 4). Estas se forman simples o en pares, terminales o intercalares y poseen un tamaño de 5 a 15 micras de diámetro (Bhushan y Chand, 1992; Ahmed y Reddy, 1993 y Haware, 1998). Gracias a ellas el hongo sobrevive en condiciones ambientales desfavorables y en el suelo como saprófito de vida libre en ausencia de plantas hospedantes. Hasta el momento no se conoce la fase perfecta del hongo (Nelson *et al.*, 1983 y Romero, 1993).

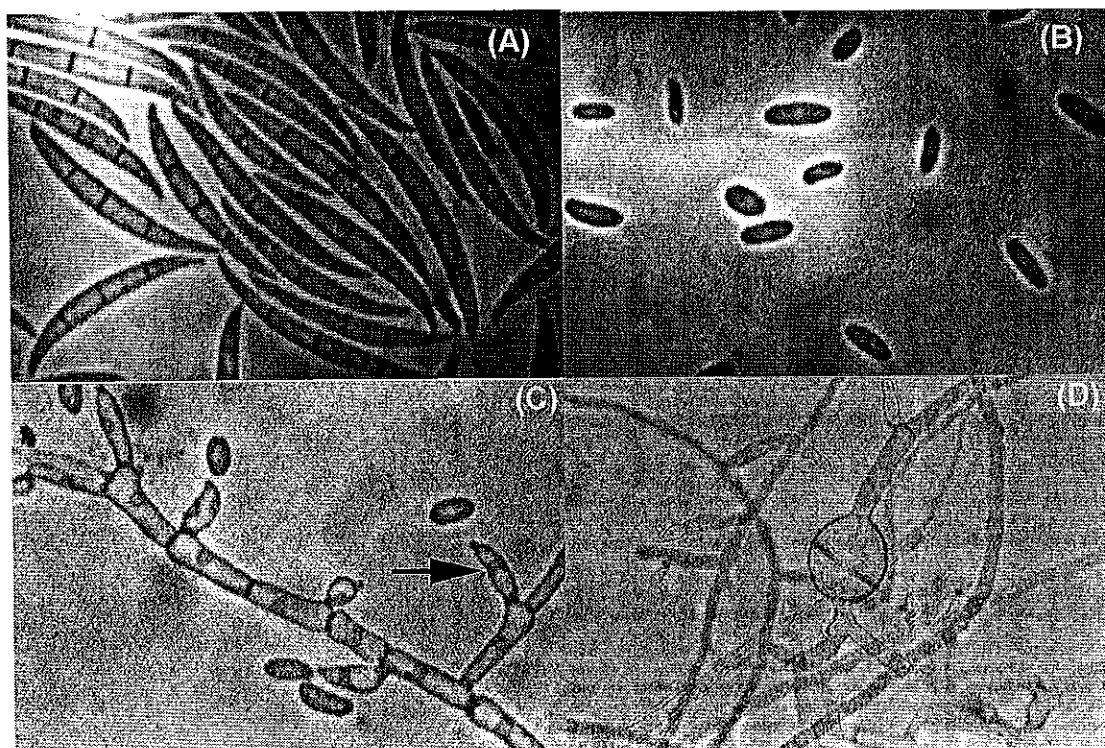


Figura 4. Características morfológicas de *Fusarium oxysporum*. A) macroconidios con septas, B) microconidios unicelulares, C) Microconidioforos, D) Clamidosporas (tomado de Crop Protection Compendium, 2001).

2.2.1.7. Razas fisiológicas

En la búsqueda de genes de resistencia a *F. oxysporum*, algunos fitomejoradores encontraron que estos genes poco a poco se acoplan dando origen a la resistencia del hospedante. Debido a esto, los científicos empezaron a investigar las causas de esta inestabilidad y fue como se detectó la existencia de formas biológicas a las que Stakman y Piemeisel llamaron razas fisiológicas⁴ (Sandoval, 1997).

⁴ **Raza fisiológica.** Una subdivisión de una especie de parásito caracterizada por su especialización a un cultivar o varios cultivares de una especie de hospedante.

Se han identificado siete razas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* (raza 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6) en base a su respuesta en plantas diferenciales de garbanzo (JG 62, C 104, JG 74, CPS-1, BG-212, WR-315, Annigeri, Chaffa, L-550, 850-3/27 y Santo Domingo). Trabajos realizados en España con razas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* revelan la existencia de dos patotipos⁵ diferentes, uno causante de síntomas de amarillamiento y otro de marchitez en la planta infectada. Las razas 1, 2, 3, 4, 5 y 6 inducen síntomas de marchitez que se manifiesta con una flacidez en las hojas y desecación de los folíolos, tornándose en un color verde-grisáceo, el cual se extiende a toda la planta; por lo que los folíolos, pecíolos y tallos acaban adquiriendo un color marrón claro, los folíolos permanecen adheridos al raquis y finalmente las plantas mueren 20 días después de ser inoculadas. La raza 0 causa amarillamiento progresivo y descendente, los folíolos comienzan a amarillarse desde las hojas inferiores para posteriormente afectar a las superiores; ya necrosados los folíolos suelen desprenderse del raquis y la planta muere 40 días después de la inoculación. Sin embargo algunos aislamientos de la raza 1 procedentes de California (USA) inducen el síntoma de amarillamiento y otros de la misma raza procedentes de España, India, Marruecos y también de California, causan marchitez. Con base a pruebas realizadas con líneas diferenciales de garbanzo los aislamientos de la raza 1 se han dividido en subgrupos. La raza 1A induce marchitez, mientras que los aislamientos 1B y 1C inducen amarillamiento en ausencia de marchitez (Kelly y Alcalá-Jiménez, 1994; Jiménez-Díaz, 1994 y Kelly *et al.*, 1998). Para ambos síntomas, el xilema, la médula de la raíz, cuello y tallos presentan una coloración marrón oscura (Figura 5) (De Miguel, 1991).

⁵ **Patotipo.** Es el síntoma típico de una enfermedad.



Figura 5. Síntomas de amarillamiento y marchitez causados por *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* en plantas de Garbanzo.

Dado la importancia económica de este patógeno, se han desarrollado estrategias para la detección de marcadores moleculares para el rápido diagnóstico de esta enfermedad, ya que los experimentos con líneas diferenciales toma por lo menos 40 días para obtener resultados (Kelly *et al.*, 1998).

Solís (1999) identificó en México las razas fisiológicas 3 y 4 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceri*, inoculando 11 plantas diferenciales con cepas del hongo aisladas de plantas enfermas de los municipios de Celaya y Yuriria del Estado de Guanajuato (Cámara, 2001).

2.2.1.8. Del Control

Se han descubierto recientemente cepas de *F. oxysporum* no patogénicas que juegan un papel importante en la supresión natural de variantes agresivas o virulentas del mismo hongo (Biles y Martyn, 1989; Agrios, 1996; Larkin *et al.*, 1996; Migheli *et al.*, 2000), tal es el caso de la utilización de *Fusarium oxysporum* cepa Fo47 y *Pseudomonas putida* cepa WCS358, en el control de la marchitez del lino y del clavel; en estos casos se observó disminución del crecimiento micelial y detención de la actividad patogénica en la cepa agresiva de *F. oxysporum*, debido a que existe competencias intraespecífica por fuentes de carbono y fierro (Duijff *et al.*, 1999). Inoculaciones de 10^7 conidios·mL⁻¹ de *Penicillium oxalicum* lograron reducir considerablemente los daños causados por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* en jitomate (De Cal *et al.*, 2000). Al igual que *P. cepacia*, realizan actividades antagónicas contra *F. oxysporum* en jitomate estimulando el crecimiento de las plantas (Beltrán, 2000; López, 2001).

Sin embargo hay estudios que demuestran que el tratamiento a la semilla de garbanzo con diferentes fungicidas incrementan significativamente la emergencia de las plántulas y retrasan la aparición de la enfermedad en cultivares moderadamente resistentes, pero no en altamente susceptibles (Trapero-Casas y Jiménez-Díaz, 1985).

Otras formas de contrarrestar los efectos de la enfermedad, es sembrar en terrenos no infestados por el hongo, adelantar fechas de siembra, realizar riegos en presiembra y en prefloración, fertilización fosfórica y aplicación de

materia orgánica. El uso de micorrizas endótrofas, extractos de ajo (*Allium sativum*) y neem (*Azadirachta indica*) no están suficientemente fundamentados (De Miguel, 1991 y Rodríguez, 2001).

El uso de variedades resistentes es el método de control más práctico, económico y eficiente para contrarrestar la enfermedad. Siendo el ICRISAT⁶ (International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics) y el ICARDA⁷ (International Center for Agricultural Research in the Dry Areas) dos de las instituciones que desarrollan trabajos relacionados con la selección de materiales de garbanzo con resistencia genética a este patógeno (Jiménez-Díaz, 1994 y De Miguel, 1991).

2.3. Caracterización e identificación

El género *Fusarium* incluye aislamientos desde saprófitos hasta patógenos activos, que colonizan al hospedante en algún momento de su ciclo biológico. Cada estado se relaciona con las condiciones ambientales así como la sensibilidad del hospedante y su estado fisiológico. La variabilidad morfológica, fisiológicas y de virulencia de *Fusarium* ha provocado problemas en su identificación, por ello se han desarrollado técnicas y métodos basados en el análisis de marcadores moleculares para el estudio de este género (Gordon y Martyn, 1997 y González *et al.*, 1998).

Es importante un diagnóstico rápido, preciso y de bajo costo de esta enfermedad; rápido, porque la marchitez puede producirse a partir de semillas

⁶ <http://www.icrisat.org>

⁷ <http://www.icarda.cgiar.org>

infestadas lo que podría provocar su diseminación en áreas libres del patógeno; y preciso, para que con base en el agente causal, se apliquen las medidas fitosanitarias adecuadas (Cabrera de la Colina *et al.*, 1988 y Cámara, 2001).

A pesar de los grandes avances en la detección de enfermedades aún se recurre a las técnicas tradicionales que involucran el crecimiento del patógeno, en medios de cultivos. Entre las estrategias que se requieren normalmente para llegar a la identificación del género y especie se encuentran: la determinación de las características morfológicas y metabólicas, pruebas de patogenicidad y rango de hospedantes (plantas diferenciales).

Mirete (1999), menciona que cepas de *Fusarium* y otros hongos se clasifican según la función de un determinado gen o la sintomatología que causa, además de la preferencia de un hospedante específico (forma especial).

2.3.1. Plantas diferenciales

Son un conjunto de plantas que al inocularse, manifiestan una reacción específica que permite distinguir las razas fisiológicas diferentes de un patógeno, especie o raza del mismo; se les conoce como plantas diferenciales y son utilizadas a nivel mundial. Una raza fisiológica se basa en el principio de la existencia de la variabilidad entre los organismos y se define como grupo de individuos morfológicamente idénticos, pero que se caracterizan por atacar en diferente grado de virulencia, a individuos de la misma especie (Robinson, 1989; Maclean *et al.*, 1993; Agrios, 1996 y Pérez, 1997).

Para la identificación de las razas fisiológicas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* se han establecido los siguientes cultivares (Figura 6): para las razas 1, 2, 3 y 4 las plantas diferenciales son: JG 62, C 104, JG 74, CPS-1, BG-212, WR-315, Annigeri, Chaffa, L-550 y K-850. Mientras que para las razas 0, 5 y 6 las plantas son JG 62, C 104, JG 74, CPS-1, BG-212, WR-315 y las líneas 12-07/10054, ICCV-2, ICCV-4, PV-24 y P-2245 (Haware y Nene, 1982; Trapero-Casas y Jiménez-Díaz, 1985; Phillips, 1988 y Jiménez-Díaz, 1994).

Sus reacciones a las razas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* se citan de forma resumida en el cuadro siguiente:

Cuadro 1. Variedades diferenciales de garbanzo y sus reacciones a razas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceri*.

VARIEDADES	REACCION						
	RAZA 0	RAZA 1	RAZA 2	RAZA 3	RAZA 4	RAZA 5	RAZA 6
JG - 62	R	S	S	M	S	S	S
C -104	M	S	S	R	S	S	S - M
JG - 74	R	R	S - M	R	R	S	R
CPS - 1	R	R	S	S	M	S	R
BG - 212	R	R	S	M	M	R	R
WR - 315	R	R	R	S - M	R	R	R
ANNIGERI	-	S	S	S	S	-	R
CHAFFA	-	S	S	S - M	S	-	R
L - 550	-	S	S	M	S	-	S - M
K - 850	-	S	M	M	M	-	R

Haware y Nene (1982) las razas 1 a 4 en la India. Cabrera de la Colina et al. (1985) las razas 0 y 5 en España y Phillips (1988) la raza 6 en California, E. U. A. R = Resistente (0 -20 % de mortalidad); M = Moderadamente susceptible (21 - 50% de mortalidad); S = Susceptible(mayor 50% de mortalidad)

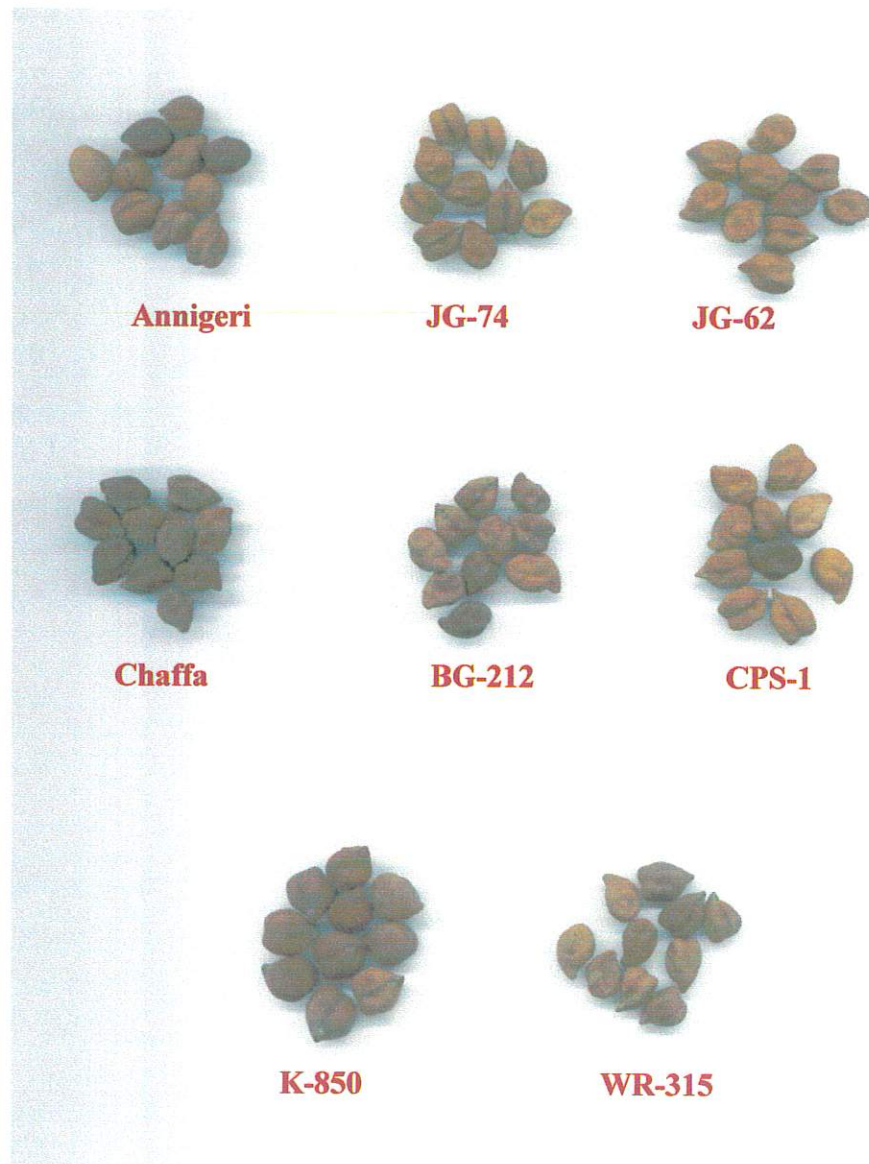


Figura 6. Semillas representantes de cultivares de plantas diferenciales utilizadas en esta investigación.

2.3.2. Marcadores

La estimación de la variabilidad de una población se puede realizar mediante el análisis de diferentes tipos de marcadores, los cuales han sido muy útiles en estudios de taxonomía, migración y filogenia de fitopatógenos.

Un marcador es cualquier característica morfológica, molécula de proteína, enzima, ARN o ADN que permite establecer diferencias entre los organismos o grupos de organismos que se comparan (Valadez y Kahl, 2000). Nos permiten estudiar el origen y la evolución de razas dentro de una población facilitando la identificación de genes de interés y la construcción de mapas genéticos.

Los marcadores con esta función se clasifican convencionalmente en morfológicos, genéticos y bioquímicos.

2.3.2.1. Marcadores morfológicos

Estos marcadores se han utilizado en estudios de diversidad genética de especies cultivadas, permitiendo analizar aspectos cuantitativos de interés agronómico y proveer información útil en el mejoramiento genético de las plantas, ya que son caracteres fáciles de detectar (por ejemplo; los genes que causan deficiencia en la clorofila o enanismo en las plantas). En el caso de los microorganismos, los marcadores morfológicos pueden ser utilizados para diferenciarlos en cuanto a forma y color de la colonia, tipo de micelio, susceptibilidad a fagos o antibióticos, requerimientos nutricionales, entre otros.

La desventaja en la utilización de estos marcadores es que la mayoría son afectados por condiciones ambientales que pueden enmascarar los efectos del gen o de los genes de interés (Aguilar, 2003).

2.3.2.2. Marcadores genéticos

Los marcadores genéticos nos permiten realizar un análisis directo de traslocaciones, inversiones, inserciones o deleciones en regiones internas del ADN, en secuencias discretas y específicas. Para ello se han desarrollado tecnologías como la PCR (Polymerase Chain Reaction, por sus siglas en inglés), hibridación molecular como los RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphic, por sus siglas en inglés) y técnicas complejas que involucran a las dos anteriores, tales como AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphic, por sus siglas en inglés) (Almanza, 2000).

Estos marcadores se han utilizado en la identificación de patógenos como *Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc. y *Fusarium culmorum* (W. G. Sm.) Sacc. (Kelly *et al.*, 1998), *Rhizoctonia solani* Kühn, *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Lams.-Scrib. (González y Simpson, 1997).

Las ventajas de estos marcadores es que son reproducibles en cualquier etapa del desarrollo de un organismo, son independientes del fenotipo, el número de polimorfismos que se pueden detectar es casi ilimitado y existe una gran variedad de técnicas disponibles que son muy versátiles, ya que permiten detectar huellas genómicas, identificar o etiquetar genes, hacer mapas genéticos y lógicamente, diagnosticar enfermedades (Valadez *et al.*, 2001). Presenta ventajas especiales en microorganismos difíciles de cultivar, difíciles de identificar después de ser cultivados o presentes en cantidades escasas.

Sus desventajas son la utilización de radioactividad, que son muy laboriosas y costosas, se necesitan grandes cantidades de ADN y de buena calidad (Valadez y Kahl, 2000 y Aguilar, 2003).

2.3.2.3. Marcadores bioquímicos

Los marcadores bioquímicos que más se han trabajado son las isoenzimas y las proteínas de semillas (de reserva o totales) que han sido ampliamente usados en la caracterización de Germoplasma, en estudios filogenéticos de microorganismos y en la evaluación de variación proteínica e isoenzimática (Perales, 2000).

Las isoenzimas presentan ciertas ventajas sobre los marcadores morfológicos ya que la metodología para su estudio es muy sencilla. Las isoenzimas son formas múltiples de una enzima constituida de varias cadenas polipeptídicas, que catalizan la misma reacción y que difieren en su estructura primaria, sus propiedades fisicoquímicas y su regulación (Valverde y Paredes, 1996). Sin embargo esta metodología es de uso limitado debido a que su reproducibilidad depende del estado de desarrollo del organismo y de las condiciones de los tejidos usados para el análisis, además de que sólo detectan una mínima cantidad de polimorfismos por experimento (Valadez y Kahl, 2000). En hongos, las isoenzimas son utilizadas para el análisis de la variabilidad genética como en estudios de la diversidad de especies de *Puccinia* y *Colletotrichum* (Bonde *et al.*, 1989).

Para obtener marcadores basados en proteínas polimórficas, la técnica más utilizada es la separación electroforética de proteínas, que pueden ser de reserva o totales. Las de reserva están principalmente en órganos o estructuras de almacenamiento (semillas y frutos, entre otros), mientras que las proteínas totales incluyen las de reserva y las presentes en todas las estructuras y membranas de organismo (González y Simpson, 1997). Para poder llevar a cabo la electroforesis de proteínas, es necesario que éstas sean solubles y para ello se utilizan diferentes compuestos como el SDS (Sodium Dodecylsulphate, por sus siglas en inglés), que permite la solubilización de las proteínas totales, principalmente las que puedan estar retenidas en los lípidos (Towner y Cockayne, 1993).

Para el análisis y purificación de las proteínas las técnicas más importantes son la cromatografía, ultracentrifugación y la electroforesis. Siendo esta última la técnica por la cual una molécula con carga neta se desplaza a través de un campo eléctrico; lo que representa una herramienta poderosa para separar las proteínas y otras macromoléculas como ADN y ARN (Stryer, 1995).

Es frecuente el uso de marcadores de proteínas para el análisis de la variabilidad genética como estudios de diversidad de especies de hongos como *Puccinia* y *Colletotrichum* Corda (Bonde *et al.*, 1989), *Peronosclerospora* (Micales *et al.*, 1988), *Tilletia indica* Mitra (Bonde *et al.*, 1989) y *Erysiphe graminis* (Rodríguez, 1999), *Colletotrichum gloeosporoides*, *Stylosanthus guariensis* (Lenne y Burdon, 1990).

En la India, Susselendra *et al.* (1992), realizaron trabajos con patrones electroforéticos de proteínas en geles de poliacrilamida con las razas 1, 2, 3 y 4 de *F. oxysporum* f. sp *ciceri*, utilizando como amortiguador de extracción de proteínas a Tris-glicina pH 8.9 0.01 M, permitiendo diferenciar dichas razas en base a los valores del Factor de Corrimiento obtenidos.

Entre las ventajas que presentan los marcadores de proteínas encontramos que su metodología es sencilla y de costos iniciales accesibles, las isoenzimas se comportan como genes codominantes con pocos efectos epistáticos y poco influenciados por el medio ambiente. Las desventajas de estos marcadores son los diferentes reactivos requeridos para cada sistema enzimático que se desee detectar, además de que el número de marcadores pueden ser insuficientes (presentan poco polimorfismo, cambios en la composición de aminoácidos y su estructura afecta la carga y conformación, por lo tanto, la movilidad electroforética de la enzima). Estos estudios están restringidos a las secuencias de ADN que codifican enzimas detectables y existen pocas de ellas que pueden ser usadas en la mayoría de los hongos. Desde el punto de vista práctico otra desventaja es el poco tiempo que se tiene para procesar las enzimas después de su purificación, dada su inestabilidad (Michelmores *et al.*, 1987; Latorre *et al.*, 1995; Weising *et al.*, 1995 y Valverde y Paredes, 1996).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Fase de laboratorio

3.1.1. Origen de las cepas utilizadas

Se utilizaron 52 aislamientos monospóricos de *F. oxysporum* f. sp. *ciceri*, aislados de raíces necrosadas de plantas de garbanzo con síntomas de amarillamiento y marchitez procedentes de los Estados de Guanajuato y Michoacán, ubicados en los paralelos 21° 01' Latitud norte y 101° 15' Longitud Oeste a una altura de 2000 msnm y 19° 42' Latitud norte y 101° 11' longitud Oeste a una altura de 1920 msnm respectivamente (INEGI, 2003⁸) (Figura 7). Estos aislamientos fueron previamente aislados y caracterizados por Cámara (2001) y Luna (2002).

3.1.2. Activación de aislamientos monospóricos

Las cepas preservadas en tubos de ensaye con medio de cultivo PDA y en papel filtro, se reactivaron utilizando el medio de cultivo Czapek (Apéndice 1) recomendado por Nelson y Tousson (1968); este medio reduce o evita mutaciones en el hongo y contribuye a disminuir la pérdida de patogenicidad. Los aislamientos que estaban deshidratados se hidrataron con agua destilada estéril y posteriormente se transfirieron a cajas Petri con medio de cultivo recién elaborado.

⁸ INEGI. 2003. <http://www.inegi.gob.mx>.

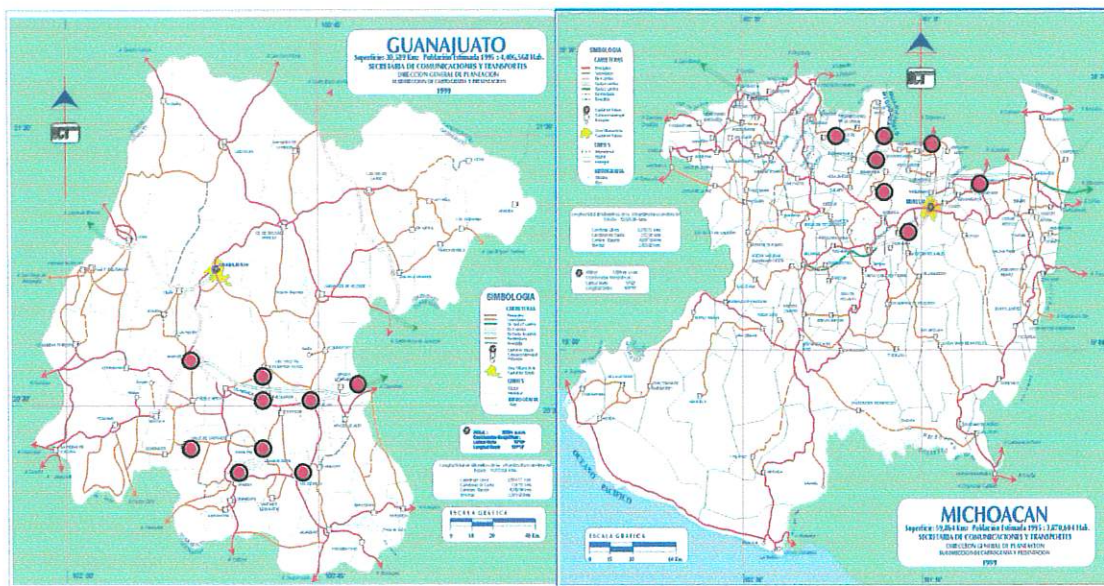


Figura 7. Origen de las cepas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* causantes de síntomas de amarillamiento y marchitez en plantas de garbanzo de la zona del Bajío, México.

3.1.3. Purificación de las cepas

Una vez activadas las cepas del patógeno se procedió a purificarlas en medio Czapek (Figura 8).

Después de ese periodo, se tomaron muestras del micelio y se observaron al microscopio compuesto, para visualizar los macroconidios y microconidios característicos de *F. oxysporum*. Posteriormente, se realizaron diluciones para obtener una baja cantidad de estas estructuras, y se procedió a sembrarlos en cajas Petri con medio de cultivo agar – agua para obtener colonias separadas a partir de cada uno de ellos.

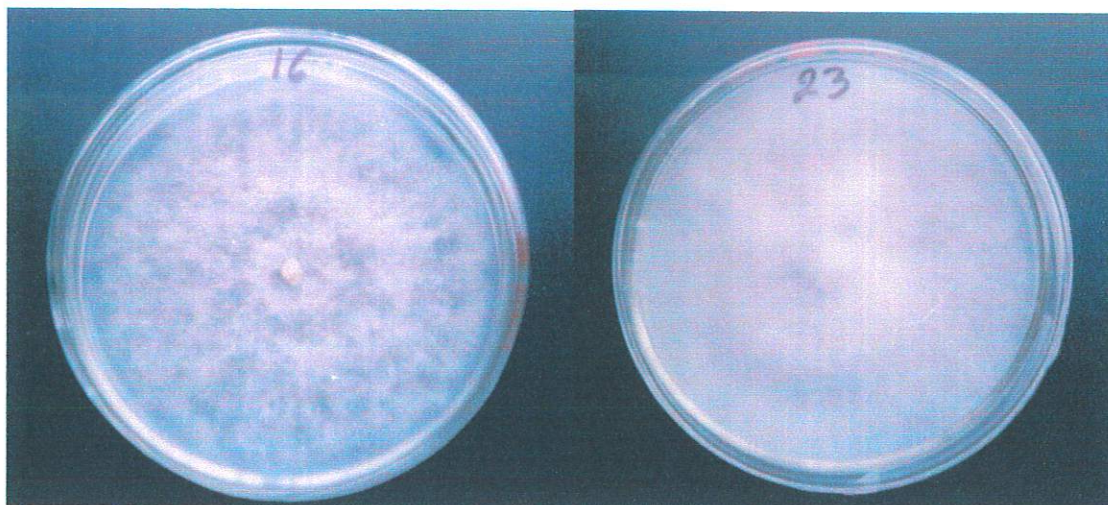


Figura 8. Aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* en medio Czapek.

Una vez purificadas las cepas, se transfirieron a cajas Petri con medio Richar's (Perales, 2000), el cual permite un rápido crecimiento del micelio con 12 horas luz y 12 horas de oscuridad a temperatura ambiente durante 5 días aproximadamente; o hasta que el micelio cubriera 3/4 partes de la caja.

3.1.4. Extracción de proteínas

La extracción de proteínas se realizó de 52 cultivos monospóricos indicados en el cuadro 2.

Cuadro 2. Aislamientos monospóricos de *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* considerados para la extracción del proteínas totales.

Clave	Estado	Localidad	Cultivo Monospórico
MC 1	Michoacán	El Calvario	1
MC2	Michoacán	El Calvario	2
MC 3	Michoacán	El Calvario	3
MC4	Michoacán	El Calvario	4
MS 6	Michoacán	Singuio	6

CONTINUACION...

MS 8	Michoacán	Singuio	8
MS 10	Michoacán	Singuio	10
MP12	Michoacán	La purísima	12
MP 14	Michoacán	La Purísima	14
MP15	Michoacán	La Purísima	15
MP 16	Michoacán	La Purísima	16
MI 17	Michoacán	El calvario (INIFAP)	17
MA21	Michoacán	Morelia	21
MA22	Michoacán	Morelia	22
MA 23	Michoacán	Morelia	23
MA25	Michoacán	Morelia	25
MA26	Michoacán	Morelia	26
MA27	Michoacán	Morelia	27
MA29	Michoacán	Morelia	29
MA30	Michoacán	Morelia	30
MA30A	Michoacán	Morelia	30A
MA31	Michoacán	Morelia	31
MA32	Michoacán	Morelia	32
MA32A	Michoacán	Morelia	32A
MCu 35	Michoacán	Cuitzeo	35
Mcu36	Michoacán	Cuitzeo	36
Mcu37	Michoacán	Cuitzeo	37
Mcu 38	Michoacán	Cuitzeo	38
GP 41	Guanajuato	Puquichapio	41
GP 42	Guanajuato	Puquichapio	42
GP 43	Guanajuato	Puquichapio	43
GVS 47	Guanajuato	Valle de Santiago	47
GVS 48	Guanajuato	Valle de Santiago	48
GYr50	Guanajuato	Yuriria	50
GYr51	Guanajuato	Yuriria	51
Gyr52	Guanajuato	Yuriria	52
GYr52A	Guanajuato	Yuriria	52A
GYr54	Guanajuato	Yuriria	54
GYr 55	Guanajuato	Yuriria	55
GYr 57	Guanajuato	Yuriria	57
GYr 57A	Guanajuato	Yuriria	57A
Gsa59	Guanajuato	Salvatierra	59
Gsa60	Guanajuato	Salvatierra	60
Gsa60A	Guanajuato	Salvatierra	60A
GSa 62	Guanajuato	Salvatierra	62
GSa 63	Guanajuato	Salvatierra	63
Gce	Guanajuato	Celaya	IB
G4A	Guanajuato	Yuriria	4A
GI	Guanajuato	Irapuato	10.5
GV7	Guanajuato	Irapuato	V.7
GAg	Guanajuato	Apaseo el grande	I.2

El micelio se recuperó de la placa Petri con la ayuda de una espátula estéril, se colocó en un mortero de porcelana estéril y se maceró con nitrógeno líquido; el macerado se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL y se agregaron 0.5 mL de amortiguador de extracción (Tris-glicina 0.01 M pH 8.9) (Susselendra *et al.*, 1992 y Perales, 2000). Posteriormente se centrifugó a 1431 g a 4° C durante 45 minutos en una centrífuga Eppendorf modelo 5810R. El sobrenadante se transfirió a otro tubo de microcentrífuga de 1.5 mL y se almacenó a 20° C.

3.1.5. Cuantificación de proteínas

Se llevó a cabo utilizando el método propuesto por Lowry *et al.* (1951), el cual consiste en colocar 11 tubos de 16 X 150 mL en un gradilla previamente etiquetados, en los cuales se adicionaron los siguientes volúmenes 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 µL de solución estandar de BSA (Bovine Serum Albumin); enseguida se agregaron 2 mL de solución D (Cuadro 3) a cada uno de los 11 tubos. Esta serie de tubos calibran mediante una grafica lineal concentraciones ascendentes de absorbancia. Para la cuantificación de las proteínas totales de los aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* se utilizaron tubos Eppendorf de 1.5 mL en la cual también se adicionaron 2 mL de la solución D más 10 mL de cada uno de la muestra a analizar. Posteriormente todos los tubos se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después de este período se les adicionó 0.2 mL de solución FOLIN (Solución E), se agitaron con vortex inmediatamente y se incubaron a temperatura

ambiente durante 30 minutos. Pasado este tiempo, se determinó la absorbancia a 600 nm de los tubos que contenían BSA y posteriormente los tubos con cada una de las muestras, correlacionando la absorbancia con la serie de los 11 tubos control.

Cuadro 3. Soluciones utilizadas en la cuantificación de proteínas totales por el método de Lowry.

Solución	Componente
A	2 % Na_2CO_3 en 0.1 N NaOH
B	1 % $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
C	0.5 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ en H_2O
D	48 mL de A + 1 mL de B + 1 mL C
E	1 parte de Folin Fenol (2N): 1 parte de agua
F	BSA: 5 mg en 5 mL de agua

3.1.6. Preparación de la muestra de proteínas

Una vez que se calculó la concentración de proteínas obtenida, se agregaron a un tubo Eppendorf de 1.5 mL, 20 μg de proteína diluidas en 25 μL con el amortiguador Laemmli (Tris-glicina 0.025 M pH 8.3, glicerol, SDS 1X al 10%, β -mercaptoetanol, azul de bromofenol al 0.05%), se desnaturalizaron durante 3 minutos en agua hirviendo y posteriormente se sumergieron en hielo para que los péptidos permanecieran separados.

3.1.7. Preparación de geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La preparación de los geles de poliacrilamida se llevó a cabo según la metodología de Laemmli (1970), preparando primero el gel separador (Apéndice 2) y alineándolo con butanol saturado después de ser vertido; una vez polimerizado el gel separador (después 30 minutos de su vaciado, aproximadamente), se retiró el butanol y se lavó con agua deionizada estéril la superficie del gel que estuvo en contacto con éste, posteriormente se vació el gel concentrador (Apéndice 3) y se colocó el peine, se dejó polimerizar durante 20 minutos, después de los cuales se procedió a retirarlo.

3.1.8. Corrimiento de las muestras de proteínas (SDS-PAGE)

Una vez que las muestras estuvieron listas, se depositaron 1250 mL del amortiguador de corrida 1X (Apéndice 4) en la cámara de electroforesis y se procedió a cargar 0.25 mg de proteína en cada pozo del gel.

La electroforesis se llevó a cabo en una cámara para tal propósito, modelo miniVe Basic (amersham pharmacia biotech), donde se colocaron dos geles en forma simultánea con 10 pozos cada uno. Los pozos de los extremos se cargaron con 5 µL de marcador de peso molecular Benchmark® (Apéndice 5) y el resto (8 pozos) con las muestras. Se usó una fuente de poder EC 105 a 123 volts durante 5 horas a 4° C.

3.1.9. Tinción y desteñido de los geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Una vez efectuada la electroforesis, los geles se colocaron en la solución de tinción (azul brillante de Coemassie 0.2%; metanol 45%; ácido acético glacial 10%) durante 12 horas; posteriormente se realizaron lavados con la solución de desteñido (metanol 5%; ácido acético glacial 7%) hasta observar las bandas.

3.1.10. Documentación y análisis de los geles (SDS-PAGE)

Los geles de poliacrilamida se capturaron y analizaron en el programa Kodak Digital Science EDAS 120. Para crear la matriz de datos se codificó la presencia (1) y ausencia (0) de bandas. A partir de estos valores, se calculó la matriz de similitud utilizando el coeficiente de apareamiento simple (Sokal and Sneath, 1963). El dendrograma se construyó con el algoritmo jerárquico UPGMA (Underweight Pair Group Mathematics Average) conocido como método del promedio utilizando el programa NTSYS.pc versión 2.0 (Sistema de Taxonomía Numérica para Análisis Multivariados) (Rohlf, 1997).

3.2. Fase de invernadero

Una vez que se obtuvieron los agrupamientos de similitud se seleccionaron representantes de 8 grupos de *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* (Cuadro 4), mismos que fueron inoculados en 8 plantas diferenciales de garbanzo (CPS-1, JG-74, K-850, BG-212, JG-62, WR-315, Chaffa y Annigeri). Cabe mencionar que no fue posible considerar al resto de las plantas diferenciales referidas en la literatura (C-104, JAMU-96, L-550, Santo Domingo-82 y Bco. Sinaloa-92) ya que no se tuvo acceso a ellas.

Cuadro 4. Aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* seleccionados por grupos y utilizados en la inoculación de plantas diferenciales de garbanzo.

Grupos de similitud	Clave	Origen	Localidad
A	MC2	Michoacán	El Calvario
	MS 10	Michoacán	Singuio
	MP 16	Michoacán	La Purísima
	MA30	Michoacán	Morelia
	GVS 48	Guanajuato	Valle de Santiago
	GYr 55	Guanajuato	Yuriria
	GSa 62	Guanajuato	Salvatierra
B	MA 23	Michoacán	Morelia
C	GYr 57A	Guanajuato	Yuriria
D	GV7	Guanajuato	Irapuato
	GAg	Guanajuato	Apaseo el grande
E	Mcu37	Michoacán	Cuitzeo
	GP 41	Guanajuato	Puquichapio
	GP 42	Guanajuato	Puquichapio
	GP 43	Guanajuato	Puquichapio
F	MP 14	Michoacán	La Purísima
	MA21	Michoacán	Morelia
	MA25	Michoacán	Morelia
G	MS 8	Michoacán	Singuio
H	MA22	Michoacán	Morelia

3.2.1. Plantas diferenciales evaluadas a los diferentes grupos de *F. oxysporum* f. sp. *ciceri*

La evaluación de la reacción producida por los diferentes grupos de *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* se realizó en ocho variedades diferenciales de garbanzo (CPS-1, JG-74, K-850, BG-212, JG-62, WR-315, Chaffa y Annigeri) que fueron facilitadas por el Centro de Investigación Regional del Noroeste (CIRNO), Campo Experimental del Valle de Culiacán-INIFAP.

Por cada variedad diferencial de garbanzo se consideraron tres plántulas que fueron inoculadas con cada hongo representante de los diferentes grupos considerados y un testigo absoluto, sin inocular (Figura 9).



Figura 9. Diseño de las plantas de garbanzo en el invernadero.

Las plantas ya inoculadas se mantuvieron en condiciones de invernadero a temperaturas entre 25° a 35° C y la humedad del suelo a capacidad de campo durante 40 días según la metodología usada por Haware y Nene (1982); es decir, suelo húmedo y no saturado de agua, para que el hongo tuviera requerimientos de humedad necesarios para su crecimiento.

3.2.2. Siembra en invernadero

Las semillas de las diferentes plantas diferenciales de garbazo, se desinfectaron mediante el siguiente proceso (Figura 10):

1. Las semillas se lavaron con agua de la llave.
2. Se colocaron en etanol 70% durante 1 minuto.
3. Se retiró el etanol y se adicionó hipoclorito de sodio 1% con una gotita de Tween-20; se homogeneizó perfectamente y se dejó reposar durante 15 minutos (agitando de vez en cuando).
4. Después se desechó la solución y se enjuagaron bien las semillas con agua destilada estéril hasta eliminar el exceso de hipoclorito de sodio.

Por la dificultad que presentaron las semillas en la germinación, se colocaron primero en toallitas de papel con humedad constante durante 7 días aproximadamente o hasta que germinaron.

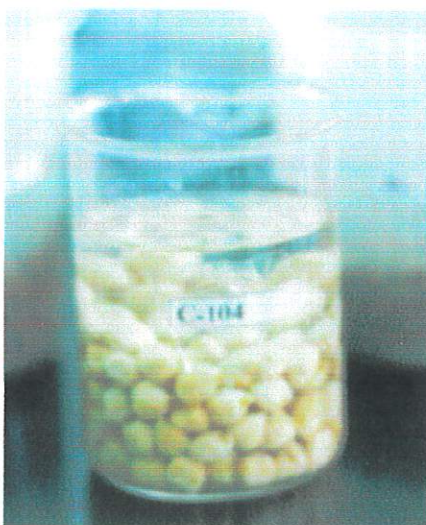


Figura 10. Desinfestación de las semillas de garbanzo.

Las plántulas se transplantaron en charolas de plástico con suelo previamente esterilizado con bromuro de metilo (Figura 11).

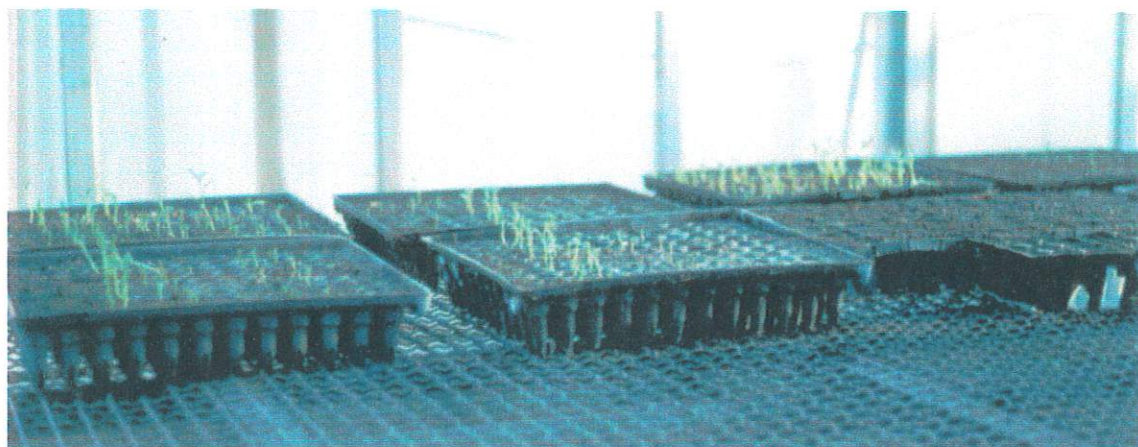


Figura 11. Plántulas de las 8 variedades diferenciales de garbanzo utilizadas en la presente investigación.

3.2.3. Preparación del inóculo

Los aislamientos seleccionados de *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* se incrementaron en cajas Petri con medio de cultivo Czapek con 12 h luz y 12 h oscuridad durante una semana a temperatura ambiente.

Una vez que los hongos se desarrollaron completamente, se preparó el inóculo (con cepas de 2 semanas de edad), licuando el contenido de cada caja en una licuadora con agua destilada. La concentración de inóculo se ajustó empleando un hematocitómetro. Posteriormente, con agua destilada se realizaron las diluciones para obtener una concentración de 1×10^6 conidios·mL⁻¹ (González, 1988; Cabrera de la Colina *et al.*, 1988 y Halila y Strange, 1997).

3.2.3.1. Inoculación del patógeno

Una vez que las plántulas tenían una semana en condiciones de invernadero se sumergieron en la suspensión de inóculo por aproximadamente 1 minuto; para posteriormente ser transplantadas a bolsas de polietileno de color negro (6 x 30 cm) con suelo previamente bromurado (2 de suelo: 1 de hojarasca) (Cabrera de la Colina *et al.*, 1988 y González, 1988).

3.2.4. Evaluación de la respuesta en invernadero en las variedades diferenciales de garbanzo a diferentes grupos de *F. oxysporum* f. sp. *ciceri*

El experimento se llevó a cabo durante 64 días registrando las reacciones presentadas por las plantas diferenciales a los 10, 20, 30, 40, 50 y 60 días después de la inoculación. Los datos obtenidos a los 40 días (propuesto en la literatura) fueron los utilizados para realizar la evaluación de las reacciones de las variedades al hongo. Después de los 40 días se consideraron posteriores evaluaciones para registrar la información hasta la muerte de las plantas.

La escala empleada para la evaluación de los materiales fue la propuesta por Haware y Nene (1982) que se basa en la presencia o ausencia de síntomas (amarillamiento o marchitez) en progresión acropétala de acuerdo a los siguientes porcentajes:

0-20%	Resistente
21-50%	Moderadamente susceptible
51% o más	Susceptible

El porcentaje se obtuvo considerando el número de foliolos de la planta entre el número de foliolos con síntomas causados por el hongo. Posteriormente se calculó la media de porcentajes de las tres repeticiones consideradas; sin embargo, para algunos casos sólo se contó con una sola repetición y de acuerdo con la escala, se le designó a cada material el tipo de reacción correspondiente.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Características morfológicas

En este estudio los diferentes aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* desarrollaron micelio abundante en algunos casos y escaso en otros, además de distintas tonalidades de colores blanco, rosa o morado al reactivarlos o crecerlos en medio nutritivo.

4.2. Extracción y cuantificación de proteínas

Para la extracción de proteínas se utilizó el protocolo de Tris-glicina pH 8.9 estandarizado por Perales (2000), ya que con el fue posible obtener la cantidad y calidad de proteínas adecuadas para establecer diferencias fenotípicas entre los diferentes aislamientos al ser separadas en electroforesis; las concentraciones que se obtuvieron variaron desde $0.6193 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ a $2.8185 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$; lo cual fue suficiente para los fines de este trabajo.

También se pudo observar que con la utilización de este protocolo se obtiene una adecuada cantidad de bandas representantes de las proteínas totales presentes en el micelio al final de la fase logarítmica del crecimiento del hongo.

4.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Las condiciones utilizadas en la electroforesis permitieron de manera general la separación y resolución adecuada de las proteínas purificadas apreciadas en forma de bandas; sin embargo, hubo algunas de ellas (bandas) que se observaron difusas y otras más, fueron poco visibles y débiles (Figura 12).

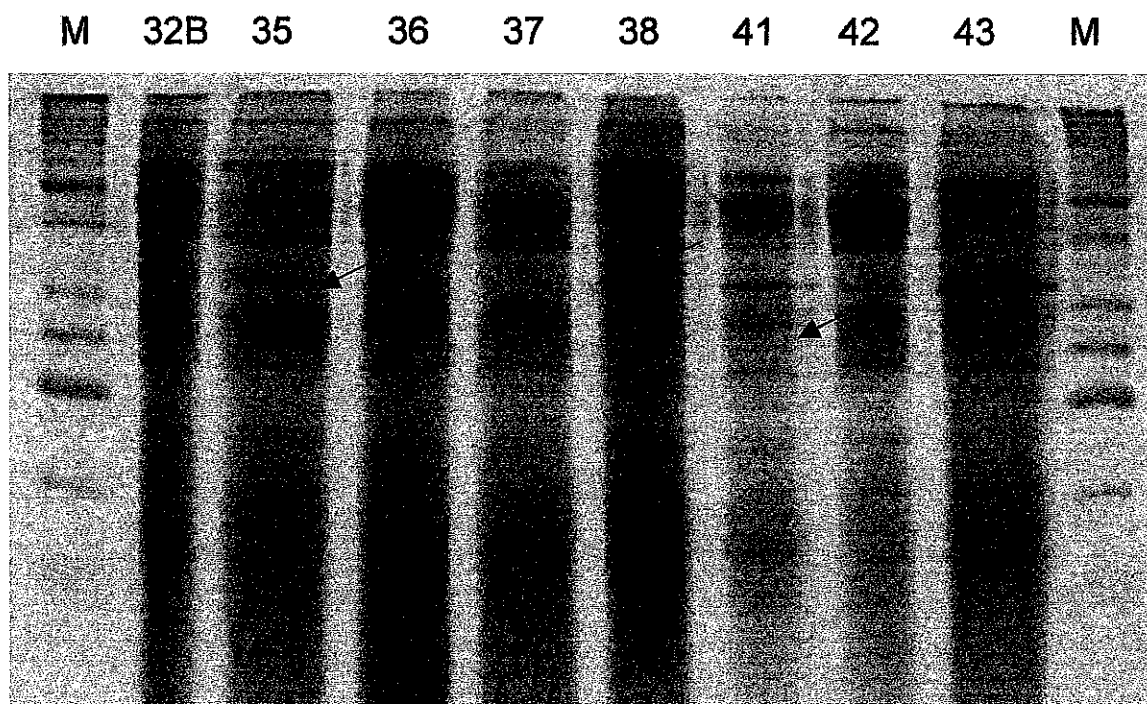


Figura 12. Geles de poliacrilamida que muestran los perfiles de proteínas totales de los aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* correspondientes a las muestras 32B, 35, 36, 37, 38, 41, 42, 43. Los carriles de los extremos de cada gel marcados con M corresponden al marcador de peso molecular Benchmark®. Las flechas indican algunas de las bandas polimórficas consideradas en el análisis de similitud.

4.4. Análisis de los resultados obtenidos de la electroforesis

Los geles obtenidos de la electroforesis de proteínas fueron capturados en el programa Kodak Digital Science EDAS 120 el cual nos permite analizar los geles y calcular los pesos moleculares de cada banda de proteína de las muestras. Los valores de peso molecular (Daltons) estimados fueron codificados con el dígito 0 para representar la ausencia y el 1 para indicar la presencia de valores similares de peso molecular entre las diferentes muestras analizadas y procesadas en el programa NTSYS.pc versión 2.0; donde se obtuvo el siguiente dendrograma:

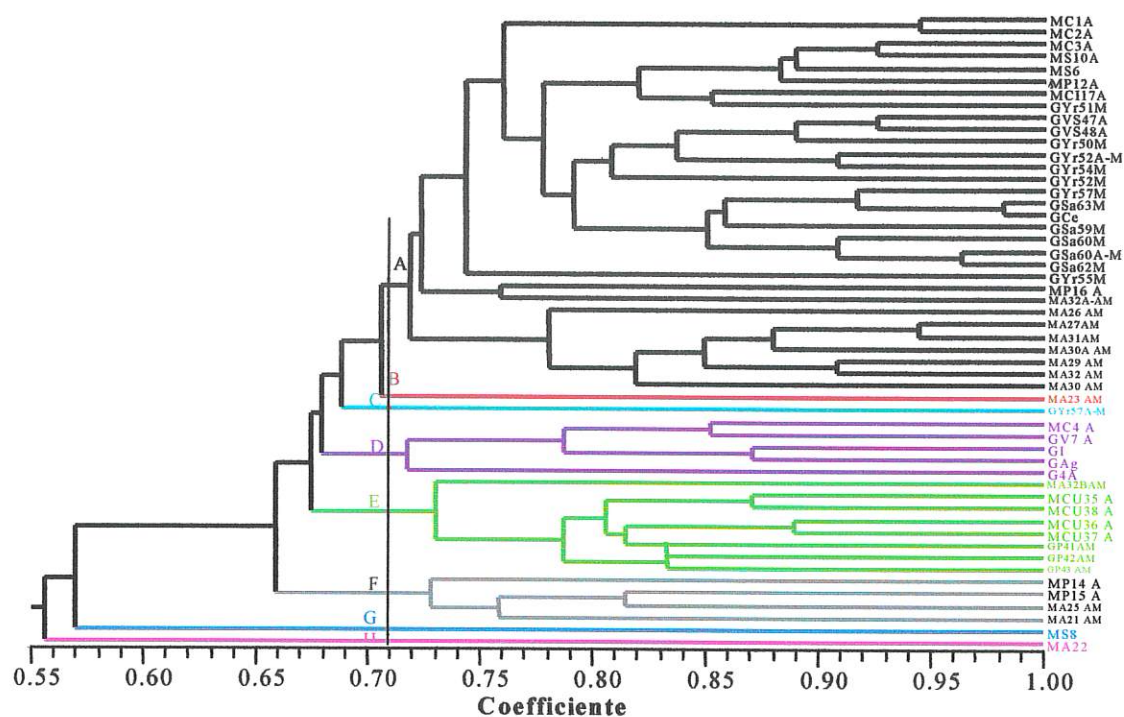


Figura 13. Relación fenotípica en base al análisis de proteínas totales de 52 aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* procedentes de la zona del Bajío.

4.5. Análisis estadístico del dendrograma

El dendrograma obtenido con los datos de la electroforesis de proteínas totales (Figura 13) indicó que los 52 aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *ciceri*, formaron diversos grupos en función a los diferentes valores del coeficiente de similitud. Por ejemplo, con un coeficiente de 0.71 se conformaron 8 grupos (A, B, C, D, E, F, G y H); mientras que con valores de similitud mayores, el número de grupos se fue incrementando en el dendrograma. La presencia de estos grupos permitió inferir una marcada variabilidad genética existente entre los aislamientos que se incluyeron en este estudio.

Perales (2000), quien utilizó esta misma técnica para diferenciar aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* con algunas de las cepas utilizadas en este trabajo identificó tres grupos bien diferenciados, los cuales podrían corresponder a las razas 1, 3 y 4 (Según Susseelendra *et al.* 1992), ya que este autor reportó algunas bandas de proteínas diferenciales para cada raza al separarlas con electroforesis; por ejemplo, la raza 1 presenta una banda con Factor de Corrimiento (Rf) de 0.23 y no presenta las bandas con Rf 0.31 y Rf 0.33; la raza 3 presenta las bandas Rf 0.20 y Rf 0.23 sin presentar las bandas Rf 0.31 y Rf 0.33; mientras que la raza 4 no presenta ninguna de las bandas anteriores pero sí las bandas con Rf 0.41 y Rf 0.64 que son diferenciales. Perales (2000) ubicó a los aislamientos G4A en la raza 1, GAg en la raza 3 y GV7 en la raza 4 contrastando con los resultados de este trabajo, en donde estos aislamientos en particular se mantuvieron agrupados juntos con un coeficiente de 0.71 de similitud (grupo D). Con respecto a estas diferencias en los agrupamientos,

algunos autores mencionan que el análisis de proteínas analizadas con la técnica utilizada en el presente trabajo, presenta desventajas al compararla con otras técnicas (por ejemplo, para análisis de ADN), ya que el número de marcadores que se obtienen son insuficientes por presentar poco polimorfismo (Flores *et al.*, 1997; González y Simpson, 1997; Valverde y Paredes, 1996); además esta técnica es susceptible a mínimos cambios externos que pueden ocurrir durante el desarrollo del protocolo o bien, también pudo deberse a que Perales (2000) partió de aislamientos crecidos en PDA y posteriormente en medio Richard's líquido; mientras que en este trabajo los aislamientos se crecieron en medio Czapek y posteriormente en medio sólido Richard's, lo cual pudo haber influido en su metabolismo (Valadez, *et al.*, 2001).

Sin embargo, los aislamientos GV7 y GAg utilizados previamente por Cámara (2001) se mantuvieron asociados también en el mismo grupo en este estudio (Grupo D).

Por otro lado los aislamientos MP14 y MP16 considerados como un mismo individuo con un coeficiente de similitud de 1.00, evaluados mediante análisis de ADN por Luna (2002), en este estudio se separaron con un coeficiente de 0.71 de similitud en el grupo F y A respectivamente, uniéndose nuevamente con un coeficiente de similitud de 0.65; mientras que Gsa62 caracterizado también por Luna (2002) como grupo independiente de los anteriores, en el presente trabajo se mantiene en el grupo A junto con MP16.

Luna (2002) utilizó para su análisis los iniciadores aleatorios Roth C-01 (5' TTCGAGCCAG 3'), Roth C-08 (5' TGGACCGGTG 3'), Roth C-11 (5' AAAGCTGCGG 3'), Roth C-19 (5' GTTGCCAGCC 3'), ubicando a los aislamientos MC1, MS6, MS8, MS10, y GYr78 en un mismo grupo; mientras que en el presente trabajo, se observó que los aislamientos MC1, MS6 y MS10 se mantienen en un mismo grupo (A) y los aislamiento MS8 y GYr78 se ubicaron en grupos separados G y D respectivamente.

Los aislamientos MC1, MC3, MS8, MS10, MA30, MCu35, MCu36, GP41, GP42 y GP43 ubicados en un solo grupo por Luna (2002), en este estudio se separan en 3 grupos bien diferenciados MC1, MC3, MS10 y MA30 (grupo A), MCu35, MCu36, GP41, GP42 y GP43 (grupo E) y MS8 (grupo G). Al igual que el aislamiento GVS48 considerado por Luna como grupo independiente, aquí se une al grupo A con un coeficiente de 0.71 de similitud. Esta variación en la ubicación de los aislamientos citados en grupos diferentes al ser analizados mediante ADN y proteínas, puede deberse a la sensibilidad de las técnicas; también es posible que esta diferencia pueda ser el resultado de una interpretación no clara en los geles de proteínas; ya que como puede notarse en la figura 10, algunas bandas son difusas o están muy juntas; o bien a factores epistáticos producidos por las proteínas en general presentes en la célula.

Teóricamente, los análisis con ADN son más precisos siempre aunque para lograr la separación de individuos o grupos, en algunos casos deben ser

exhaustivos y para lograr una interpretación de los grupos relacionados con funcionalidad específica (razas); es decir, que para aseverar que los aislamientos que se comportaron de manera diferente en el trabajo de Luna (2002) así como en el presente estudio, es necesario realizar otras pruebas adicionales; sin embargo, las proteínas analizadas en el presente trabajo están íntimamente ligadas a la fisiología de los organismos y que aunque se partió tanto en el trabajo de Luna (2002) como en el actual de un mismo aislamiento, en ambos casos se consideraron cultivos monospóricos diferentes, lo cual pudiera indicar que existe variabilidad genética en segregantes de *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* ocasionada por mutación; ya que según Ainsworth *et al.* (1995) la variación genética no proviene de intercambio entre cromosomas en este tipo de hongo, sino sobre el ciclo mitótico; o bien debido al ciclo parasexual que incrementa las capacidades genéticas del hongo porque permite la recombinación asexual del material genético entre núcleos de la hifa (Griffin, 1994).

Estos resultados nos permiten deducir que los aislamientos analizados de este estudio presentan una amplia variabilidad genética, tal como lo reportó Luna (2002), a pesar de haberse colectado en regiones muy cercanas geográficamente del Bajío, México (Figura 7) bajo el supuesto de que en esta región se encuentran al menos tres razas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* deducidas por estudios previos realizados en esta región del Bajío (Pérez, 2000 y Perales, 2000). Por otro lado la técnica empleada en el presente trabajo puede apoyar a establecer esa relación fisiológica entre los diferentes grupos.

4.6. Reacción de las variedades de garbanzo a la inoculación de los aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *ciceri*

El comportamiento mostrado por las plantas diferenciales inoculadas con los aislamientos fue diversa; algunas variedades mostraron resistencia a los aislamientos, pero la mayoría mostró susceptibilidad a los mismos.

Los resultados obtenidos a partir de la inoculación de las plantas diferenciales de garbanzo con los diferentes aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* a los 40 días después de la inoculación y bajo condiciones de invernadero se muestran en el cuadro 5. Cabe hacer notar que los primeros síntomas de amarillamiento y marchitez observados en las plantas diferenciales inoculadas con los diferentes aislamientos se presentaron entre los 8 y 10 días después de la inoculación en las variedades CPS-1 y JG-74.

Cuadro 5. Resultado de la inoculación de los aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* a las diferentes variedades de garbanzo.

Aislam. Variedad	25	23	2	30	16	V.7	41	55	57	62	14	8	10	21	1.2	22	43	37	48	42
CPS-1	S	S	S	S	R	M	M	M	S	S	M	M	M	M	S	S	M	M	M	S
JG-74	R	R	R	R	R	R	R	R	M	R	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BG-212	M	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
JG-62	S	R	M	M	M	M	R	R	R	M	M	R	R	M	S	M	R	R	S	S
Annigeri	M	R	R	M	R	M	R	R	R	M	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K-850	R	R	R	R	R	R	R	M	R	R	R	M	R	R	R	S	R	R	R	-
Chaffa	-	M	-	M	M	M	M	-	M	M	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WR-315	M	M	R	M	R	M	M	M	R	R	M	R	R	R	R	R	R	MS	M	R

R= Resistente (0 –20 % de mortalidad); M= Moderadamente susceptible (21 – 50% de mortalidad); S= Susceptible(mayor 50% de mortalidad)

Las variedades JG-74, BG-212, K-850 y WR-315 fueron las que presentaron una mayor resistencia y CPS-1 fue la variedad más susceptible a los aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *ciceri*.

El aislamiento GYr57 fue el único que presentó solo el síntoma de marchitez, mientras que los aislamientos GVS48, Gsa62, MP16, MA30, GP42, MA25 y MA22 presentaron ambos síntomas. El resto de los aislamientos solo presentaron amarillamiento.

En base a los resultados de los 20 aislamientos utilizados en el invernadero y comparándolos con los citados por diversos autores (cuadro 1) se puede suponer que posiblemente existan las razas 3, 4 y 5 en la zona del Bajío, México.

Con la finalidad de separar las razas existentes en los municipios muestreados, Solís (1999) inoculó algunos de los aislamientos evaluados en el presente trabajo, en plantas diferenciales, con lo cual pudo detectar la presencia de las razas 3 y 4 en base al protocolo propuesto por Haware y Nene (1982) (Cámara, 2001).

El uso de plantas diferenciales para la separación de razas presenta inconvenientes, tales como la necesidad de disponer de inóculo suficiente, que las plantas testigos deben estar disponibles y en el mismo estado fenológico y que transcurran varios días desde la inoculación hasta la aparición de los

primeros síntomas. Por tales motivos, el poder suponer la presencia de una determinada raza de un patógeno en un área particular, requiere de la interacción de varias técnicas de análisis; por ejemplo, análisis de ADN con iniciadores aleatorios o específicos para las razas, análisis de proteínas totales, respuestas en plantas diferenciales, etc.

5. CONCLUSIONES

En base al análisis de los resultados obtenidos, es posible concluir lo siguiente:

La electroforesis de proteínas puede servir como patrón de referencia preliminar en la diferenciación de razas fisiológicas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceri*.

Fue posible establecer diferentes agrupamientos de similitud entre los 52 aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* mediante patrones electroforéticos de proteínas totales.

De acuerdo a los agrupamientos fenotípicos del hongo y su reacción en plantas diferenciales, se especula que existen las razas 3, 4 y 5 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* en la región garbancera del Bajío, México.

6. LITERATURA CITADA

- Agrios, G. N. 1996.** Fitopatología. Editorial Limusa 2 ed. México. 838 pp.
- Aguilar, R. J. 2003.** Uso de nuevas técnicas en la detección y análisis genético de Fitopatógenos de importancia cuarentenaria. En: Memorias del evento de aprobación para signatario de laboratorio de diagnóstico fitosanitario, Tomo II: Base técnica. Chapingo, Edo. de México.
- Ahmed, K. M. and Ready, C. 1993.** A pictorial guide to the identification of seedborne fungi of sorghum, pearmilleti, finger, chickpea, pigeonpea and groundnut. ICRISAT. India. 14 pp.
- Ainsworth, D. L. 1973.** Introduction and keys to higher taxa in Ainsworth, D. L., Sparrow, K. F. Sussman, S. (eds). The fungi an advanced treatise. Academic Press New York. 2-3 pp.
- Ainsworth, D. L., Kirk, P. M., Sutton, B. C. and Pegler, D. N. 1995.** Dictionary of fungi. Eighth Edition. CAB International.
- Alexopoulos, J. C. and Mims, W. C. 1979.** Introductory Mycology. Tenth edition. John Wiley & Sons. New York, USA. 632 p.

- Almanza, P. M. I. 2000.** Estudios comparativos de diversidad genética en trigos harineros de primavera (*Triticum aestivum* L. em. Thell) utilizando coeficientes de parentesco y marcadores moleculares. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de postgraduados. Montecillos, México. 19-22 p.
- Andrade, A. E. 1989.** Carretera-145 variedad de garbanzo porquero de riego para el Centro y Sur de Guanajuato. SARH-INIFAP. Celaya, México. 11 p.
- ASERCA. 1997.** El garbanzo. Claridades Agropecuarias 42:1-44.
- Aykroyd, W. R. and Doughty, J. 1982.** Legumes in human nutrition. Food and agriculture. Organization of United Nations. Rome, Italy. 242 p.
- Baayen, P. R., O'Donnell, K., Bonants, M. J., Cigelnik, E., Kroon, M. N., Roebroek, A. J., and Waalwijk, C. 2000.** Gene genealogies y AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic y nonmonophyletic formae speciales causing wilt y rot disease. Phytopathology 90: 891-900.
- Barreto, B. P. 2001.** Reacción de especies de garbanzo silvestre y líneas cultivadas a la inoculación con las razas tres y cuatro de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. Tesis profesional. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, Edo. de México. 50 p.

- Beltrán, R. G. M. 2000.** Evaluación de la eficacia de la cepa 1BI de *Pseudomonas* en el control de *Fusarium oxysporum*, bajo diferentes dosis y métodos de aplicación, en el cultivo de tomate. Memoria-tesis. Escuela de Biología. Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán, Sinaloa, México. 84 p.
- Biles, C. L. and Martyn, R. D. 1989.** Local and systemic resistance induced in watermelons by formae speciales of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 79:856-860.
- Blancard, D., Lecoq, H. Q. y Pitrat, M. 1991.** Enfermedades de las Cucurbitáceas. Mundi Prensa. Madrid, España. 301 p.
- Bonde, M. R., Peterson, C. L. and Matsumoto, T. T. 1989.** The use of isozyme to identify teliospores of *Tilletia indica*. *Phytopathology* 79:596-599.
- Bosland, P. 1998.** *Fusarium oxysporum*, a pathogen de many plant species. *Plant Pathology* 6: 281-285.
- Booth, C. 1971.** The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute. Kew, UK. 237 pp.
- Bhuschan, L. J. and Chand, H. J. 1992.** Chick-pea wilt. In: SINGH, U.S., MUKHOPADHYAN, A.N., KUMAR, J. and H.S. CHAUBE (ed). *Plant Diseases of International Importance: Diseases of Cereals Pulse*. Prentice Hall, USA. 429-444.
- Butler, E. J. 1918.** Fungi and plant disease. Bishen Singh, Mahendra Pal Singh and Periodical Experts. Dehradun and Delhi. 547 p.

- Cabrera de la Colina, C. J., Trapero, C. A. and Jiménez-Díaz, R. M. 1985.**
Races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* in Andalusia, southern Spain. International Chickpea Newsletter. 13:24-26.
- Cabrera de la Colina, C. J., Trapero, C. A. y Jiménez-Díaz, R. M. 1988.**
Influencia del ambiente sobre la reacción de cultivares de garbanzo a las razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. ETSIA. Universidad de Córdoba. Córdoba, España. 393-404 pp.
- Cámara, M. A. 2001.** Diferenciación de aislamientos de *Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. *ciceri* (Padw) Matuo & Sato. Por RAPDs. Tesis de Maestría en Ciencias en Protección Vegetal. Depto. de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Edo. de México. 54 pp.
- Caperton, C. M., Martyn, R. D., and Starr, J. L. 1986.** Effects of *Fusarium* inoculum density and root-knot nematodes on wilt resistance in summer squash. Plant Disease 70:207-209.
- Chattopadhyay, S. B. and Sen Gupta. 1967.** Studies on wilt diseases of pulses. I. Variation and taxonomy of *Fusarium* species associated with wilt disease of pulses. Indian Journal of Mycological Research 5: 45-53.
- Chelkowski, J. 1989.** *Fusarium* mycotoxins, taxonomy and pathogenicity. Elsevier Science Publisher. New York. 494 p.
- Coronel, E. F. 1980.** Sistemas de producción del cultivo de garbanzo en el área de influencia del CIAPAN. SARH. Folleto No. 2. Publicación técnica CIAS. No. 2. Culiacán, Sinaloa, México. 74 p.

- Crispín, M. A. y López G. H. 1976.** El garbanzo: un cultivo importante en México. Folleto de Divulgación No. 156. INIA-SARH. México. 30 p.
- Crop Protection Compendium, 2001.** CAB International. Iowa, State University, U.S.A.
- Cruz, O., García, E. y Carrillo, F. 1998.** Enfermedades de las hortalizas. Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán de Rosales, Sinaloa, México. 19-29 pp.
- Dastur, J. E. 1935.** Gram wilt in the central provinces. Agriculture and livestock. India 5:615-627.
- De Cal, A., García-Lepe, R. and Malgarejo, P. 2000.** Induced resistance by *Penicillium oxalicum* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*: Histological studies of infected and induced tomato. Plant Pathology 48: 260-266.
- De Candolle, A. 1883.** Origine des plants cultivées. Paris. 258-260 pp.
- De Miguel, G. E. 1991.** El garbanzo. Una alternativa para el secano. Ediciones Mundi – Prensa. Madrid, España. 131 p.
- Díaz, F. A., González, G. N. y Ortegón, M. A. S. 1996.** Rabia del garbanzo: hongos asociados y su efecto en la producción. Revista Mexicana de Fitopatología 14: 51-54.
- Duijff, B. J., Recorbet, G., Bakker, P.A.H.M., Loper, J. E., and Lemanceau, P. 1999.** Microbial antagonism at the root level is involved in the suppression of *Fusarium* wilt by the combination of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 and *Pseudomonas putida* WCS358. Phytopathology 89:1073-1079.

- Erwin, D. C. 1958.** *Fusarium lateritium* f. sp. *ciceri*. Incitant of *Fusarium* wilt of *Cicer arietinum*. Phytopathology 48: 498.
- Flores, O. A., Martínez, S. J. P. y Martínez, E. A. D. 1997.** Nuevas tecnologías en la detección y el análisis genético de Fitopatógenos. En: Tópicos selectos en Fitopatología. Genética Molecular. Martínez, S. J. P. y Martínez, E. A. D. (Eds.). Sociedad Mexicana de Fitopatología A. C. 24-43 pp.
- Goodman, R. N., Királ, Z. Y Wood, K. R. 1986.** The Biochemistry y Physiology of Plant Disease. University of Missouri Press. 433 p.
- Gómez, G. R. M. y Paredes, P. V. 1984.** El cultivo del garbanzo blanco en el centro de Sinaloa. Folleto técnico No. 4. SARH-CIAPAN-INIA. 32p.
- Gómez, G. R. M., Aviles, G. M. K. y Pérez, V. J. J. 1997.** Manejo del cultivo del garbanzo blanco en el centro de Sinaloa. INIFAP. Culiacán, México. 28 p.
- Gómez, G. R. M., Aviles, G. M. K., Pérez, V. J. J. y Manjares, S. J. R. 1998.** El cultivo de garbanzo blanco en el centro de Sinaloa. Folleto para productores No. 41, 2ª edición. INIFAP. 32 p.
- González, A. M. 1988.** Enfermedades fungosas del frijol en Cuba. Científica-Técnica. La Habana, Cuba. 152 p.
- González, Ch. y Simpson, J. 1997.** Diversidad genética en hongos (origen y análisis) en Soriano, J. Y Espinoza, A. (eds). Tópicos Selectos en Fitopatología: Genética Molecular. Sociedad Mexicana de Fitopatología A. C. CINVESTAV unidad Irapuato, México. 37-38 pp.

- González, M., Rodríguez, R., Zavala, Ma. E., Jacobo J. L., Hernández, F., Acosta, J., Martínez, O. and Simpson, J. 1998.** Characterization of mexican isolates of *Colletotrichum lindemutianum* by using differential cultivars and molecular markers. *Phytopathology* 88:292-299.
- Gordon, T. R. and Martyn, R. D. 1997.** The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. *Annu. Review of Phytopathology* 35:111-128.
- Griffin, D. H. 1994.** Fungal Phisiology. 2a edición. Wiley-Liss. E.U.A.
- Halila, M. H. and Strange, R. N. 1997.** Screening of kabuli chickpea germplasm for resistance to *fusarium* wilt. *Euphytica* 96:273-279.
- Haware, M. P. and Nene, Y. L. 1982.** Races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. *Plant Disease* 66:809-810.
- Haware, M. P. 1998.** Diseases of chickpea. In: ALLEN, D. J. and J. M. LENNE. (Ed). The pathology of food and pasture legumes. CAB INTERNATIONAL. U.K. 473-509.
- Herrera, T. y Ulloa, M. 1998.** El reino de los hongos. *Micología Básica Aplicada*. Fondo de cultura económica S. A. de C. V. México.
- ICRISAT/ICARDA. 1990.** Chickpea in the Nineties: Proceeding of the seconds international workshop en chickpea improvement. ICRISAT Center. Patancheru, India. 403 p.
- INIFAP. 1998.** El cultivo del garbanzo blanco en el Centro de Sinaloa. Folleto para productores No. 41. Culiacán, Sinaloa. 32 p.

Jiménez-Díaz, R. M., Trapero-Casas, A. and Cabrera de la Colina, J. 1989.

Races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* infecting chickpeas in southern Spain. In: Tjamon E. C., Beckman CH, eds. NATO ASI Serie H Vol. 28. Vascular wilt diseases of plants. Heidelberg: Springer-Verlag. 515-520.

Jiménez-Díaz, R. M., Alcalá-Jiménez, A. R., Hervás A. and Trapero-Casas,

J. L. 1993. Pathogenic variability and host resistance in the *Fusarium oxysporum* f. sp. *Ciceris/Cicer arietinum* pathosystem. In: Arseniuk E, Goral T. Eds. Proceedings of the 3er European Seminar on *Fusarium*: Mycotoxins, Taxonomy, Pathogenicity and Host Resistance. Plant Breeding and Acclimatisation Institute, Radzików, Poland. 87-94.

Jiménez-Díaz, R. M. 1994. La fusariosis vascular del garbanzo causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*: quince años de investigación en España. Investigaciones Agrarias 2:285-294.

Jiménez-Díaz, R. M. 1996. Interacciones planta-hongo: mecanismos de infección, patogénesis y resistencia en Yacer G., López M., Trapero, A. y Bello, A. (eds) Patología Vegetal. Sociedad Española de Fitopatología. España. 739-769 p.

Kelly, A. G. and Alcalá-Jiménez, R. 1994. The use of amplified fragment length polymorphisms (AFLPs) of genomic DNA for the characterization of isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* en Schots A., Dewey F., Oliver R. (eds). Modern assay for plant pathogenic Fungi eds. 75-81 p.

- Kelly, A. G., Bainbridge, B. W., Heale, J. B., Pérez-Artes, E. and Jiménez-Díaz, R. M. 1998.** In: Plant-polymerase chain reaction detections of the wilt inducing pathotypes of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* in chickpea (*Cicer arietinum*). Physiological and Molecular. Plant Pathology 52:397-409.
- Kendrick, B. 2000.** The Fifth Kingdom. Third edition. Focus Publishing. USA. 374 p.
- Kistler, H.C., Alabouvette, C., Baayen, R. P., Bentley, S., Brayford, A., Coddington, A., Correl, J., Daboussi, M.J., Elias, K., Fernandez, D., Gordon, T.R., Katan, T., Kim, H.G., Leslie, J.F., Martyn, R.D., Migheli, Q., Moore, N.Y., O'Donnell, K., Ploetz, R.C., Rutherford, M.A., Summerell, B., Waalwijk, C., and Woo, S. 1998.** Systematic numbering of vegetative compatibility groups in the plant pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. Phytopathology 88: 30-32.
- Lammli, U. K. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. London. 227: 680-685.
- Larkin, R. P., Hopkins, D. L. and Martin, F. N. 1996.** Suppression of *Fusarium* wilt of watermelon by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* and other microorganisms recovered from a disease-suppressive soil. Phytopathology 86: 812-819.
- Latorre, B. A., Pérez, G. F., Wilcox, W. F. and Torres, R. 1995.** Comparative protein electrophoretic and isoenzymic patterns of *Phytophthora*

cryptogea isolates from chile and kiwi fruit and Nort America denduous fruits. Plant Disease 79:703-708.

Lenne, J. M. and Burdon, J. J. 1990. Preliminary study of virulence and isozymic variation in natural populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from *Stylosanthes guianensis*. Phytopathology 80:728-731.

López, C. A. C. 2001. Evaluación de la eficacia de la cepa TII8A de *Pseudomonas* en el control de *Fusarium oxysporum*, bajo diferentes métodos de aplicación, en el cultivo de tomate. Memoria-tesis. Facultad de Ciencias Bioquímicas. Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán, Sinaloa, México. 60 p.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal Biology Chemistry 193: 265-275.

Luna, P. A. 2002. Variabilidad Genética de Cepas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* mediante RAPD-PCR en el Bajío, México. Tesis de Maestría en Ciencias en Protección Vegetal. Depto. de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Edo. de México. 63 p.

Maclean, D. J., Braithwaite, K. S., Manners, J. M. and Irwin, J. A. G. 1993. How do we identify and classify fungal plant pathogens in the era of DNA analysis. Plant Pathology 10:207-244.

- Mateos, H. M. 1996.** El cultivo del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en México. Tesis profesional. Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 1-61 pp.
- Mckerral, A. 1923.** A note on *Fusarium* wilt of gram in burma and measures taken to combat it. Agric. Journal India 28. 608.
- Micales, J. A., Bonde, M. R. and Peterson, G. L. 1988.** Isosyme analysis and aminopeptidase activities within the genus *Peronosclerospora*. Phytopathology 78:1296-1402.
- Michelmore, R. W. and Hulbert, S. H. 1987.** Molecular markers for genetic analysis of phytopathogenic fungi. Annu. Review Phytopathology 25:383-404.
- Microsoft. 2001.** Enciclopedia Encarta 2001. Edición Básica. Microsoft Corporation. USA.
- Migheli, Q., Steinberg, C., Daviere, J. M., Olivian, C., Gerlinger, C., Gautheron, N., Alabouvette, C. and Daboussi, M. J. 2000.** Recovery of mutants impaired in pathogenicity after transposition of *Impala* in *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. Phytopathology 90: 1279-1284.
- Mirete, C. S. 1999.** Análisis mediante la técnica PCR-RFLP dela región espaciadora intergénica (IGS) del rDNA en el género *Fusarium*. Tesis profesional. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España. 92 p.
- Narasimhan, R. 1929.** A preliminary note on a *Fusarium* parasitic on bengal gram (*Cicer arietinum*). In: Madras Agric. Dep. Year Book. 5.

- Nelson, P. E. and Toussoun, T. A. 1968.** A pictural guide to the identification of *Fusarium* species. The Pennsylvania State University Press. London. U. K. 51 p.
- Nelson, P., Toussoun, T. and Marasas, W. 1983.** *Fusarium* species. An: Illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press University Park and London. 5-14, 47 pp.
- Neman, K. B. and Karen, M. N. 1973.** A Conspectus of Wilt of Bengal Gram in Madhya Pradesh. Symposium on Wilt Problem and Breeding for Wilt Resistance in Bengal Gram. Indian Agr. Res. Inst. New Delhi, India.
- Padwick, G. W. 1940.** The genus *Fusarium* III. A Critical study of the fungus causing wilt of gram (*Cicer arietinum* L.) and of the related species of the sub-section orthoceras with special relation to variability of the key characteristics. Indian Journal Agric. Sciences. 10: 241.
- Prasad, N. and Padwick , G. W. 1939.** The genus *Fusarium* II. A species of *Fusarium* as a cause of wilt of gram (*Cicer arietinum* L.). Indian Journal Agric. Sciences 9: 371.
- Perales, R. D. 2000.** Identificación de razas fisiológicas de *Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. *ciceris* (Padw.) Matuo & Sato, mediante patrones electroforéticos de proteínas. Tesis profesional. Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Edo. de México. 42 p.
- Pérez, de la Vega, M. 1997.** El uso de marcadores moleculares en genética vegetal y mejoramiento. Invest. Agr. Prod. Vegetal. 12: 33-60.

- Pérez, G. O. 2000.** Selección de líneas de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) resistentes a las razas fisiológicas tres y cuatro de *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *ciceri*. Tesis profesional. Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Edo. de México. 42 p.
- Phillips, J. C. 1988.** A distinct race of chickpea wilt in California. International Chickpea Newsletter 18: 19-21.
- Robinson, R. A. 1989.** Manejo del hospedante en patosistemas agrícolas. Colegio de Postgraduados. Montecillos, Edo. de México. 281 p.
- Rodríguez, R. H. 1999.** Revisión sobre el uso de marcadores moleculares en hongos Fitopatógenos. Tesis profesional. Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Edo. de México. 14-32 pp.
- Rodríguez, H. C. 2001.** Plantas contra plagas. Red de Acción sobre Plaguicidas y Alternativas en México. Universidad Autónoma Metropolitana. Texcoco. Edo. de México. 133 p.
- Rohlf, F. J. 1997.** NTSYS.pc: Numerical taxonomy and multicarionate analysis system, versión 2.0. Amplied Biostatistics, New York.
- Romero, C. S. 1993.** Hongos fitopatógenos. Universidad Autónoma Chapingo. Dirección General del Patronato Universitario. Chapingo México. 347 pp.
- SAGAR, 2001.** Anuario estadístico de la producción agrícola de los Estados Unidos Mexicanos. Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera 355-363 pp.

- Sandoval, I. J. S. 1997.** Algunos estudios sobre la resistencia cuantitativa en el patosistema cebada (*Hordeum vulgare* L.), roya amarilla (*Puccinia striiformis* Westend f. sp. *hordei* Ericks.). Tesis de Doctor en Ciencias. Colegio de Postgraduados. México. 144 p.
- Saxena, N. P., Saxena, M. C., Johansen, C., Virmani, S. M. and Harris, H. 1996.** Adaptation of chickpea in the West and North Africa Region. ICRISAT. Andhra Pradesh, India. 262 p.
- Sokal, R.R. and Sneath, P. H. A. 1963.** Principle of numerical taxonomy. Freeman, San Francisco, USA. 359 p.
- Stryer, L. 1995.** Bioquímica. Reverté, S. A. Madrid. 440 p.
- Suseelendra D., Nene, Y. L. and Reddy, A.G. 1992.** Races of *Fusarium oxysporum* causing wilt in chickpea-serological and electroforetic variability. Indian. Phytopathology 4:421-425.
- Taylor, W. J., Jacobson, J. D. y Fisher, C. M. 1999.** The evolution of asexual fungi: reproduction, speciation y clasification. Annu. Review Phytopathology 37: 197-246.
- Towner, K. J. and Cockayne, A. 1993.** Molecular methods for microbial identification and typing. CHAPMAN & HALL. U.K. 202 p.
- Trapero-Casas, A. and Jiménez-Díaz, R. M. 1985.** Fungal wilt and root rot diseases of chickpea in southern Spain. Phytopathology 75:1146-1151.
- Ustimenko, G. V. 1982.** El cultivo de plantas tropicales y subtropicales. MIR. Moscú, Rusia. 429 p.

- Valadez, M. E. y G. Kahl. 2000.** Huellas de DNA en Genomas de Plantas. (Teoría y protocolos de laboratorio). Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Mundi-Prensa México. D.F. México. 147 p.
- Valadez, M. E., Kahl, G. J. R., Bruno, H. y Rubluo-Islas, A. 2001.** Técnicas moleculares para la caracterización de genomas vegetales (Garbanzo) y algunas aplicaciones potenciales. Revista Fitotecnia Mexicana 24:103-120.
- Valverde, M. E. y Paredes, L. O. 1996.** El uso de marcadores moleculares en el estudio de la biodiversidad "el caso de los hongos". Rev. Ciencia y Desarrollo. XXII: 29-37 pp.
- Van der Maesen, C. J. G. 1972.** *Cicer L.*, A monograph of the genus with special reference to the chickpea its ecology and cultivation. Mededekingen lanbouwhogschool wageningen Neadesly. 1-8, 290-291 pp.
- Van der Maesen, C. J. G. 1987.** Origen, history and taxonomy of chickpea. En *The Chickpea*. ICARDA, Aleppo, Siria. 11-34 pp.
- Vavilov, N. I. 1951.** The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants. Chronica Botanica. New York. 13-16. 26-38, 75-78, 151 pp.
- Weising, K., Atkinson R. G. and Gardner, R. C. 1995.** Genomic fingerprinting by microsatellite-primed PCR-a critical evaluation. PCR Methods Applic. 4:249-255.

7. APÉNDICE

Apéndice 1. Componentes para preparar un litro de medio de cultivo Czapek-Dox.

Componentes	Cantidades
Sacarosa	30.0 g
Nitrato de sodio	2.0 g
Fosfato dipotásico	1.0 g
Sulfato de magnesio	0.5 g
Cloruro de potasio	0.5 g
Sulfato ferroso	0.01 g
Agar	18.0 g
Agua destilada	1000 mL

Apéndice 2. Componentes del gel separador de poliacrilamida (12%), según Laemmli (1970).

Componentes	Cantidades (mL)
Acrilamida-bisacrilamida (30:0.8)	2.4
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	1.5
SDS 10%	0.06
Agua deionizada	1.98
TEMED	0.0024
Persulfato de amonio 10% P/v	0.064

Apéndice 3. Componentes del gel concentrador de poliacrilamida (12% para 6 mL), según Laemmli (1970).

Componentes	Cantidades (mL)
Acrilamida-bisacrilamida (30:0.8)	0.415
Tris-HCl 1.5 M pH 6.8	0.315
SDS 10%	0.025
Agua desionizada	1.7
TEMED	0.0025
Persulfato de amonio 10%	0.025

Apéndice 4. Componentes del amortiguador de corrida 5X, pH 8.3.

Componentes	Cantidades
Tris (121.1 g/mol)	3.020 g
Glicina (75.07 g/mol)	18.8 g
SDS al 10% ρ/v	10.0 mL
Agua deionizada estéril	1000 mL

Apéndice 5. Pesos moleculares de las bandas del marcador de proteínas

Benchmark®.

Banda	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Kilodaltons	220	160	120	100	90	80	70	60	50	40	30	25	20	15	10