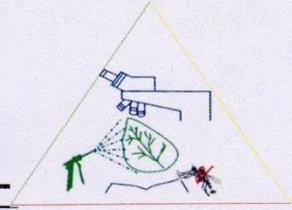




UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO



DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA AGRÍCOLA

**MAESTRÍA EN CIENCIAS
EN PROTECCION VEGETAL**

**ESPECIES DE *Fusarium spp.* CAUSANTES DE LA
ESPIGA BLANCA Y PUDRICIÓN DE LA RAÍZ DE TRIGO
(*Triticum aestivum L.*) EN EL BAJÍO, MÉXICO.**

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL**



DIRECCION GENERAL ACADEMICA/
DIREPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
DIRECCION DE EXAMENES PROFESIONALES

PRESENTA:

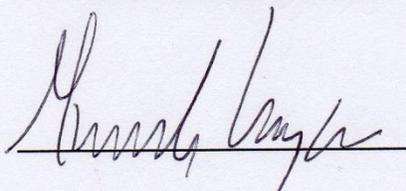
HANS ERROL VEGA PORTILLO

CHAPINGO, ESTADO DE MÉXICO, SEPTIEMBRE DE 2013



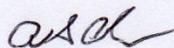
La presente tesis titulada **ESPECIES DE *Fusarium* spp. CAUSANTES DE LA ESPIGA BLANCA Y PUDRICIÓN DE RAÍZ DE TRIGO (*Triticum aestivum* L.) EN EL BAJÍO MÉXICO** fue realizada por **HANS ERROL VEGA PORTILLO**, bajo la dirección y asesoría del consejo particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL**.

CONSEJO PARTICULAR



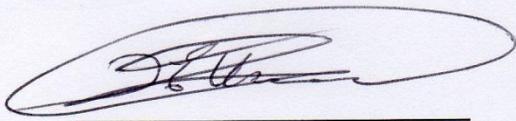
DIRECTOR

Dr. S. Gerardo Leyva Mir



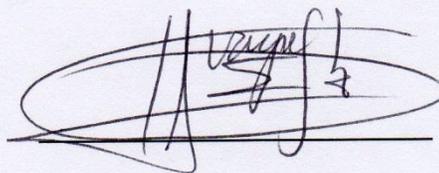
ASESOR

Dr. Omar G. Alvarado Gómez



ASESOR

Dr. Héctor Eduardo Villaseñor Mir



ASESOR

Dr. Mateo Vargas Hernández

ESPECIES DE *Fusarium* spp. CAUSANTES DE LA ESPIGA BLANCA Y PUDRICIÓN DE RAÍZ DE TRIGO (*Triticum aestivum* L.) EN EL BAJÍO MÉXICO

Hans Errol **Vega-Portillo**¹, Gerardo **Leyva-Mir**¹, Mateo **Vargas-Hernández**¹ Omar G. **Alvarado-Gómez**² Héctor Eduardo **Villaseñor-Mir**³

¹Protección Vegetal, Universidad Autónoma Chapingo. ² Universidad Autónoma de Nuevo León. ³ INIFAP-CEVAMEX.

RESUMEN

En el año 2012 se colectaron plantas de trigo de la variedad Cortázar S94, en la localidad de Tepetate de Negrete municipio de Pénjamo, Guanajuato, con la finalidad de identificar el o los agentes causales de la espiga blanca y la pudrición de raíz de trigo. Se utilizaron varios métodos de identificación como caracterización morfológica, microscopía electrónica, PCR, y se realizaron los Postulados de Koch. De acuerdo con la caracterización morfológica se logró aislar hongos presentes en la raíz de trigo como *Fusarium graminearum* y *F. proliferatum*, sembrados en medio de cultivo PDA y A.A., teniendo incidencias de 40% y 65% respectivamente. Dado lo anterior se infiere que la Fusariosis de la espiga y de la raíz de trigo está siendo causada por las especies *F. proliferatum* y *F. graminearum*. Se realizaron inoculaciones a semillas de trigo de 28 variedades susceptibles a la fusariosis para observar necrosamiento de raíz y a partir de ese síntoma reaislar el patógeno y comprobar los agentes causales de la pudrición de raíz de trigo y espiga blanca. Se realizaron montajes para observar las estructuras reproductivas de las especies de *Fusarium*, con mayor incidencia, al microscopio electrónico de barrido y así poder tomar mediciones de conidios en sus fialides. Las secuencias de ADN de las muestras amplificadas por PCR de los cultivos monospóricos dieron un 99% de coincidencias para *F. proliferatum* y con esto último se pudo comprobar que esta especie es la que se encuentra con mayor incidencia en la zona de Pénjamo, Guanajuato y causa los síntomas de espiga blanca y pudrición de raíz en trigo.

***Fusarium* SPECIES CAUSE OF WHITE TASSEL AND WHEAT ROOT ROTTING
(*Triticum aestivum* L.) IN THE BAJIO MEXICO.**

SUMMARY

In 2012 wheat plants of Cortazar S94 variety were collected in Tepetate de Negrete, Guanajuato, with the objective of identify the causal agent (s) of the white tassel and the wheat root rotting. Different identifying methods were utilized, like morphologic characterization, electronic microscopy, PCR, and the Koch postulated were realized. Throughout the morphologic characterization it was successful isolated the fungus into the wheat roots like *Fusarium graminearum* and *F. proliferatum*, fungus were seed in a culture PDA and AA, it has incidences of 40% and 65%, respectively. Due the preceding results we can infer that the fusariosis on the tassel and root is caused by the species *F. proliferatum* and *F. graminearum*. It was realized inoculations on 28 varieties of wheat seeds susceptible to the Fusariosis to observe wheat necrosis and starting from this symptom re-isolated the pathogen and prove the cause agents of root rotting and white tassel. It was realized assemblies to observe on electronic microscope the reproductive structures of *Fusarium* species with larger incidence, and then to take measures of conidians on its phialides. The sequences of the DNA amplified by PCR from samples of mono-spores casted out a 99% of similarity to *F. proliferatum* and with this final result it could prove, this specie is most finding in the zone of Penjamo, Guajuato and it is cause of the symptoms of white tassel and root rotting wheat.

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por el apoyo económico durante mis estudios de Maestría.

Al **Dr. Gerardo Leyva Mir** por haberme permitido realizar la presente investigación bajo su valiosa dirección y asesoramiento, por el apoyo, interés y amistad mostrada durante los dos años de la Maestría, por todos los consejos ofrecidos dentro y fuera de las responsabilidades académicas y su disponibilidad para lograr la finalización de este trabajo.

Al **Dr. Omar Alvarado Gómez** por brindarme y ofrecerme sus amplios conocimientos y aportaciones para la realización de esta investigación.

Al **Dr. Mateo Vargas Hernández** por las asesorías brindadas durante el experimento de esta tesis.

Al **Dr. Héctor Eduardo Villaseñor Mir** por la disponibilidad de resolver duda y el material proporcionado para la realización de este trabajo de investigación.

A la **M.C. Bertha Tlapal Bolaños** por su disponibilidad de atenderme en las dudas y el apoyo ofrecido para la realización de este trabajo, aclaración de dudas, compartir información y su amplia experiencia y amistad.

A la **Biol. Greta Hanako Rosas Saito** Por la disponibilidad en la realización de pruebas así como al **Laboratorio de Microscopía Electrónica del Colegio de Posgraduados** por la disponibilidad y conocimientos en el tema.

A la **Sra. Mariana y el Sr. Juan** del **Laboratorio de Micología del Departamento de Parasitología Agrícola**.

A todos los profesores de Maestría en Protección Vegetal que durante estos dos años compartieron sus experiencias y conocimientos para formarme como profesionalista.

DEDICATORIAS

A mi madre la **Sra. Manuela Portillo Gil** por todo el gran esfuerzo y apoyo que me ha brindado no solo en estos dos años si no a lo largo de mi vida, que fue mi pilar de desarrollo, mi motivación de ser algo más y seguir preparándome profesionalmente y personalmente, por eso y mil cosas más Muchas gracias Mama.

A mi tía **Francisca Portillo Gil** que ha sido la tía más cercana y a la que quiero más, y ha sabido apoyarme moralmente, por su cariño, su forma de tratarme. Gracias tía.

A mi novia **Luz del Carmen Catalán Espinosa** por su paciencia en estos dos años lejos de ella y por su apoyo y motivación para concluir esta parte de mi vida, y así poder brindarle lo mejor que se merece, dado que es una gran persona y forma parte importante en mi vida y lo seguirá siendo.

A mis tíos **Margarita, Elia, Rodolfo y Loreto** por sus palabras de ánimo y apoyo hacia la nueva meta que me propuse.

Por ultimo dedicar a mis primos **Viridiana, Nadia, Jhair, Edwing, Noel, Juan Carlos y Ana Paola** que en todo momento y a su forma de ser me dieron aliento y ánimo para terminar mis estudios de maestría.

CONTENIDO

RESUMEN GENERAL	III
SUMMARY GENERAL.....	IV
AGRADECIMIENTOS.....	V
DEDICATORIAS	VI
CONTENIDO	VII
LISTA DE CUADROS	IX
LISTA DE GRAFICAS.....	IX
LISTA DE FIGURAS	X
INTRODUCCION GENERAL	1
CAPITULO I. ETIOLOGIA DE LA ESPIGA BLANCA Y PUDRICIÓN DE RAÍZ DE TRIGO (<i>Triticum aestivum</i> L.) EN EL BAJÍO MÉXICO	20
RESUMEN.....	20
SUMMARY	21
INTRODUCCION	22
OBJETIVOS.....	29
HIPÓTESIS.....	29
MATERIALES Y MÉTODOS	30
RESULTADOS.....	36
DISCUSIÓN.....	48
CONCLUSIÓN	50

BIBLIOGRAFÍA.....	51
CAPITULO II. IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE <i>Fusarium spp</i> POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA Y PCR EN TRIGO (<i>Triticum aestivum L.</i>) EN EL BAJÍO MÉXICO	58
RESUMEN.....	58
SUMMARY	58
INTRODUCCIÓN.....	59
OBJETIVOS.....	62
HIPOTESIS.....	62
MATERIALES Y MÉTODOS.....	63
RESULTADOS.....	67
DISCUSIÓN	73
CONCLUSIÓN	75
BIBLIOGRAFÍA.....	76
CONCLUSIONES GENERALES.....	80
BIBLIOGRAFÍA CITADA EN INTRODUCCIÓN GENERAL.....	81
ANEXOS.....	91

LISTA DE CUADROS

CAPITULO II

- Cuadro 1 Primers utilizados para la amplificación del ADN aislado a partir de micelio de *Fusarium spp.* 65

LISTA DE GRAFICAS

CAPITULO I

- Gráfica 1 Comparación múltiple de medias por el método de Tukey, con nivel de significancia al 5% para la variable porcentaje de necrosis en raíz con inoculación de *Fusarium spp.* 43
- Gráfica 2 Comparación múltiple de medias por el método de Tukey, con nivel de significancia al 5% para la variable porcentaje de germinación con inoculación de *Fusarium spp.* 44
- Gráfica 3 Comparación múltiple de medias por el método de Tukey, con nivel de significancia al 5% para la variable longitud de raíz con inoculación de *Fusarium spp.* 45
- Gráfica 4 Comparación múltiple de medias por el método de Tukey, con nivel de significancia al 5% para la variable follaje con inoculación de *Fusarium spp.* 46
- Gráfica 5 Comparación múltiple de medias por el método de Tukey, con nivel de significancia al 5% con inoculación y sin inoculación (testigo) para las variables porcentaje de necrosis en raíz, porcentaje de germinación, longitud de raíz y longitud de follaje. 47

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO I

Figura 1 Siembra en cámara húmeda para la formación de fialides	32
Figura 2 Preparación de la solución del inóculo	34
Figura 3 Inoculación a la semilla de 28 variedades de trigo	35
Figura 4 a) Siembra de las semillas previamente inoculadas; b) Variedades con cuatro repeticiones y su testigo	35
Figura 5 Coloraciones y tipo de colonia fungal; a) <i>F. graminearum</i> en PDA; b) <i>F. graminearum</i> en pulpa de papa; c) <i>F. proliferatum</i> en PDA; d) <i>F. proliferatum</i> en pulpa de papa	37
Figura 6 a) Macroconidios de <i>F. graminearum</i> ; b) Esporodoquio	38
Figura 7 a) Microconidios de <i>F. proliferatum</i> ; b) Macroconidios; c) Microconidios en cadena; d) Polifialides	39
Figura 8 a) Semillas no germinadas con pudrición; b) Semillas con la presencia de micelio en la testa	40
Figura 9 a) Plántula deforme; b) Plántula con micelio en la semilla; c,d) Comparación testigo y repeticiones (Tlaxcala y Bátán)	41
Figura 10 Preparaciones de los reaislamientos de la pudrición de raíz de trigo; a) <i>F. graminearum</i> ; b) <i>F. proliferatum</i>	42

CAPITULO II

Figura 11 Micrografías de Macroconidios pertenecientes a *F. proliferatum*, las micrografías fueron tomadas a un aumento de a) 3,500 X y b) 3,000 X. La morfología de los macroconidios coincide con lo que Leslie y Summerell (2006) mencionan para la especie en cuestión, macroconidios de 3-5 septas, célula apical curvada; y las medidas tomadas entran dentro del rango que el autor describe. 68

Figura 12 Micrografías de a) Pseudoclamidospora y b) Polifialides; pertenecientes a *F. proliferatum*, las micrografías fueron tomadas a un aumento de 6,000 X y 2,500 X respectivamente. Leslie y Summerell mencionan que *F. proliferatum* no forma clamidosporas verdaderas, es por eso que para este caso se les denomina Pseudoclamidosporas, y a diferencia de *F. verticillioides*, esta especie *F. proliferatum*, forma polifialides. 68

Figura 13 Micrografías de Microconidios pertenecientes a *F. proliferatum*, las micrografías fueron tomadas a un aumento de a) 3,000 X y b) 5,000 X, en esta última se muestra la comparación de dos Macroconidios vs dos Microconidios. Los Microconidios son en forma de tabique de paredes delgadas y las medidas tomadas entran dentro del rango que Leslie y Summerell mencionan en el 2006. 69

Figura 14 Electroforesis en gel de agarosa con los productos obtenidos de la amplificación por PCR con los primers ITS1/ITS4 de 6 aislados de *Fusarium spp.* (1-6). La flecha señala los productos obtenidos de 532-553 pb aproximadamente. M marcador de peso molecular ladder-100 (Axygen). 70

Figura 15 Electroforesis en gel de agarosa con los productos obtenidos de la amplificación por PCR con los primers EF-1/EF-2 de 3 aislados de *Fusarium spp.* (1-3). La flecha señala los productos obtenidos de 700 pb aproximadamente. M marcador de peso molecular ladder-100 (Axygen). 71

- Figura 16 Electroforesis en gel de agarosa con los productos obtenidos de la amplificación por PCR con los primers PRO-1/PRO-2 de 6 aislados de *Fusarium spp.* (1-6). La flecha señala los productos obtenidos de 585 pb. M marcador de peso molecular ladder-100 (Axygen). 72
- Figura 17 Electroforesis en gel de agarosa con los productos obtenidos de la amplificación por PCR con los primers ITS-1/proITS-R de 6 aislados de *Fusarium spp.* (1-6). La flecha señala los productos obtenidos de 390 pb. M marcador de peso molecular ladder-100 (Axygen). 72
- Figura 18 Electroforesis en gel de agarosa con los productos obtenidos de la amplificación por PCR con los primers CL1/CL2A de 6 aislados de *Fusarium spp.* (1-6). La flecha señala los productos obtenidos de 751-755 pb. M marcador de peso molecular ladder-100 (Axygen). 72

INTRODUCCION GENERAL

La crisis de alimentos recurrentes, los precios volátiles de los energéticos, el agotamiento de los recursos naturales, el cambio climático y la amenaza de estilos de vida de millones de personas en pobreza, y contabilizando, de los 5 alimentos de la humanidad, el trigo ocupa el segundo lugar, solo el arroz le gana por su fuente de calorías y contenido de proteínas usado en países en vías de desarrollo. El trigo proporciona 21% de las calorías alimenticias y el 20% de la proteína a más de 4, 500 millones de personas en 94 países en desarrollo (Braun *et al.*, 2010).

El trigo se cultiva en aproximadamente 215 millones de hectáreas en todo el mundo, desde el Ecuador hasta latitudes de 60 °N y 44 °S y en altitudes que van desde el nivel del mar hasta más de 3, 000 m. aproximadamente 630 millones de toneladas son producidas anualmente, la mitad de ellas en países en desarrollo. La demanda de trigo en los países en desarrollo se prevé que aumente un 60% en el año 2050; al mismo tiempo, el cambio climático inducido por el aumento en la temperatura se espera que reduzca su producción en los países en desarrollo en un 29% (Rosegrant *et al.*, 1995).

El cultivo de trigo en México es importante para el desarrollo socioeconómico del país, ya que es una de las fuentes más importantes de nutrientes en la dieta del mexicano, sobre todo para las poblaciones rurales y urbanas de escasos recursos, y porque tanto su cultivo como su procesamiento y su consumo generan una importante derrama económica y un gran número de empleos en varios sectores y actividades de la cadena del Sistema Producto Trigo (Peña *et al.*, 2008).

Desafortunadamente, en México la producción de trigo comenzó a disminuir gradualmente desde finales de la década de 1990, a tal punto que en la actualidad la industria molinera tiene que importar más del 50% (más de 3 millones de toneladas) del trigo harinero que consume (Peña *et al.*, 2008). Esta es una situación preocupante, ya que ha mermado la disponibilidad de trigo (y otros cereales) y su precio en el mercado internacional sigue elevándose, sobre todo

debido a la mayor demanda de granos básicos por parte de países en pleno desarrollo (como la India y China); incrementos en la producción de maíz para la producción de biocombustibles en EEUU; incrementos en el precio de los insumos del agro (energéticos, fertilizantes y otros); y cambios climáticos (más calor y menos agua, entre otros) (Peña *et al.*, 2008). En conjunto, estos factores han afectado negativamente la producción de cereales y la reserva mundial de los mismos. La problemática del abasto de productos básicos representa una gran amenaza para la seguridad alimentaria de varios países. Dado lo anterior, es fundamental que en México se impulse la producción de trigo, teniendo en cuenta que la economía de mercado exige que los nacionales de trigo satisfagan al mismo tiempo las necesidades de rentabilidad del productor y de calidad en el mercado. (Peña *et al.*, 2008)

Las principales zonas productoras de trigo en México se encuentran en el Bajío y Noroeste del país. Existen en México seis zonas importantes en la producción de trigo: la Noroeste, que abarca los estados de Sonora, Sinaloa y Baja California Norte y Baja California Sur; la del Bajío, que comprende Querétaro, Guanajuato, Jalisco y Michoacán; la de la Laguna, que incluye parte de Durango y Coahuila; la Norte que agrupa Chihuahua, Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas; la Zona Centro o Valles altos que incluye los estados de México, Puebla, Hidalgo y Tlaxcala. (Vargas, 2006).

En México el rendimiento promedio es de 5.2 toneladas por hectárea. El cultivo se realiza en la mayor de los estados de la República Mexicana, de los cuales sobresalen Sonora, Guanajuato y Baja California por su alta participación de las superficies de riego que se destinan a este cultivo y el nivel de producción que alcanzan. (SIACON, 2010).

La zona de los Valles Altos de México comprende a los estados de Tlaxcala, Hidalgo, Puebla y México; en este último el trigo se cultiva de manera temporal en los distritos de Texcoco, Jilotepec, Zumpango, Atlacomulco y Toluca principalmente (Hernández, 1992).

Históricamente el estado de Guanajuato ha jugado un papel clave en la producción de trigo; en el Bajío surge y se desarrolla a partir de la colonización, conforme se establece y crece la población española. La sustitución de la ganadería por los cereales cobra un auge en la región entre los años de 1742 y 1792, en forma paralela al incremento de la población que en ese periodo rebasa el 250% (INIA, 1980).

El trigo cultivado de riego por superficie sembrada es el cultivo más importante durante el ciclo otoño invierno en el Bajío. El promedio de siembra de trigo en el estado de Guanajuato es de 101 000 ha, con un rendimiento de 6 t ha⁻¹ (SIACON, 2006).

Las variedades que ocupan mayor superficie en el estado de Guanajuato, de acuerdo a la semilla certificada producida son Bárcenas S2002 con 29%, Cortázar S94 con 22% y Saturno S86 con 11%. Sin embargo, cerca de 50% de la superficie de trigo en Guanajuato se siembra con semillas criollas de la cual se desconoce la proporción que ocupa cada variedad (Solís *et al.*, 2008).

Los principales municipios productores de trigo en el Bajío son: Salamanca, Pénjamo, Valle de Santiago, Irapuato, Abasolo, Jaral del Progreso, Villagrán, Cortázar, Huarimaro, León, Pueblo Nuevo, Cueramaro, Silao, Romita, Manuel Doblado, San Francisco del Rincón, Purísima del Rincón y Apaseo el Grande (INIA, 1980).

El programa de mejoramiento genético de trigo del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) en el estado de Guanajuato tiene entre sus objetivos generar genotipos de los diferentes grupos de calidad con mayor potencial de rendimiento que las variedades comerciales de la región, resistentes a royas y de alta calidad industrial. Como resultado de los trabajos de investigación del INIFAP en 2002 se liberó la variedad Bárcenas S2002 (Solís *et al.*, 2003); los altos rendimientos que se obtienen con esta variedad ha propiciado la reducción de la superficie sembrada con la variedad Salamanca S75 y la ampliación del mosaico de variedades de trigo para la región

y con ello la disminución de las probabilidades de una epidemia que pudiera causar graves daños económicos a los productores del Bajío. (Solís *et al.*, 2003).

Entre los factores que contribuyen a la obtención de altos rendimientos de grano en trigo, el control de enfermedades ocupa un lugar importante como complemento a los demás elementos de producción como son: fecha óptima de siembra, buena preparación del suelo, uso de variedades mejoradas recomendadas para la zona, buena fertilización, riegos oportunos, combate de plagas y malas hierbas, etc. Algunas veces a pesar de aplicarse las mejores prácticas y técnicas recomendadas, los rendimientos son afectados cuando se presentan condiciones climatológicas adversas para un buen desarrollo de la planta, tales como, heladas tardías, temperaturas excesivas, granizos, etc. (Hernández, 1992).

La importancia del ciclo Otoño-Invierno de temporal se debe a las condiciones climatológicas que prevalecen en esa época del año, como mayor humedad y temperaturas más templadas, condiciones básicas para el adecuado desarrollo del cultivo así como de patógenos potenciales. Los hongos son los patógenos más importantes de las plantas y también en cuanto a patógenos transportados en semillas. Son fácilmente transportados por diversos factores incluyendo la acción del hombre a través de transacciones comerciales con semillas infectadas y el movimiento de semillas en los programas de investigación. (Moreno, 1996).

El 90% de los cultivos dedicados a la alimentación humana y animal requieren el uso de semillas. Por otra parte, se señala que alrededor de 12% del potencial de la producción agrícola se pierde debido a las enfermedades. No se tienen datos de las pérdidas causadas por hongos en las semillas en campo pero se considera que del total, es un alto porcentaje. Se ha demostrado que pequeñas diferencias en el contenido de humedad de las semillas, del orden de 0.3 – 0.5%, tienen un marcado efecto en el desarrollo de hongos. (Moreno, 1996).

Los daños que causan los hongos a los granos dependen en gran medida a la severidad del ataque y del hongo que se trate. Si la infección es muy severa

prácticamente puede destruir el grano, como frecuentemente sucede con las pudriciones por especies de *Fusarium*, si la infección no es severa, el hongo permanece en la semilla sin afectarla aparentemente, y ésta es la forma en la que un hongo es transmitido por semilla de un ciclo agrícola a otro (Vargas, 2006; Moreno, 1996)

La roña (tizón de la espiga, moho rosa, espiga blanca) se expresa en la muerte prematura de las espiguillas. La enfermedad es especialmente importante en lugares húmedos. La esterilidad de flores y el deficiente llenado de la semilla resultan en la reducción de cosechas. El hongo causal perteneciente al género *Fusarium spp*, es un parásito facultativo no específico, que puede infectar varias partes de la planta, por lo que el tizón de la espiga puede coincidir con infecciones de la raíz o de la hoja, o estar asociado con otros organismos que atizonan espigas. Estos hongos tienen requerimientos nutrimentales simples y son saprófitos omnipresentes (SARH, 1992).

La fusariosis de la espiga puede causar la putrefacción de la raíz y del tallo, causando reducciones severas de la producción de la cosecha, a menudo entre 10 y 40%. Además varias especies de *Fusarium* son capaces de producir micotoxinas que pueden ser formadas en la precosecha de las plantas infectadas que todavía están de pie en los campos o en el grano almacenado (Castañeda, 2006).

Las micotoxinas son metabolitos producidos por los hongos, las cuales son tóxicas cuando son consumidos por el hombre o por los animales. Éstas se forman en los granos de trigo infectados. Para ser producidas, el hongo requiere humedad suficiente y temperatura adecuada para el crecimiento en los sustratos. La mayor acumulación de micotoxinas ocurre en granos húmedos durante el transporte y almacenamiento. Micotoxicosis es el nombre dado a las enfermedades causadas en los animales que consumen granos infectados. Los efectos en el organismo animal son variables, desde la pérdida de apetito, rechazo al alimento, disminución de la eficacia alimentaria hasta la muerte. Las principales toxinas producidas por *Fusarium graminearum* son Zearalenona, Deoxinivalenol, Nivalenol, Fusarenona-x, Toxina T2 y otros Tricótesenos (González y Pioli, 2001).

La enfermedad causada por la fusariosis se encuentra ampliamente distribuida y ataca a la gran mayoría de los cereales y pastos en climas templados. Básicamente produce necrosis en la raíz del trigo y ataca también la parte inferior del tallo del trigo en invierno, sobre todo en áreas donde se cultiva intensiva y continuamente los cereales. Las pérdidas en estas áreas intensivas con gran incidencia de la enfermedad puede llegar a ser de hasta el 50% (Agrios, 2006). Con frecuencia, la presencia de la fusariosis del trigo se da a principios de la estación de crecimiento por la aparición de áreas de plántulas amarillentas, poco desarrolladas (achaparradas) y plantas de aspecto desagradable que tendrán pocas espigas (Agrios, 2006).

Los síntomas se manifiestan mejor en espigas inmaduras que emergen con una o más espiguillas o toda la espiguilla blanqueada. Si el raquis se infecta, todos los tejidos arriba del punto de infección se blanquean. Puntos oscuros pequeños (peritecas), micelio superficial (rosa o amarillo) y masas de esporas se pueden ver, sobre todo en la base de las espiguillas. Las espiguillas blanqueadas generalmente son estériles o tienen granos parcialmente llenados. Los granos que apenas empiezan a formarse al momento del ataque pueden ser destruidos completamente. Si la infección ocurre al final del estadio de leche o al principio de la masa, los granos resultan considerablemente arrugados (SARH, 1992).

En el caso de la raíz las lesiones se observan de color café oscuro a negro, desarrollándose sobre las plántulas a nivel del suelo extendiéndose a la base de las hojas inferiores; las plántulas pueden marchitarse o achaparrarse o morir antes de emerger, o si emergen retardan su crecimiento. Las coronas de las plántulas son infectadas por el hongo a nivel de la superficie del suelo o inmediatamente debajo de ésta y muestran un coloración café rojiza que se extiende hasta el sistema radicular de la planta. Con la sobrevivencia en invierno de las plantas de trigo y de cebada, la fusariosis disminuye de manera considerable, en ocasiones hasta 10% a 30% en trigo y de un 20% a un 60% en cebada (Agrios, 2006)

Las plantas infectadas se arrancan fácilmente del suelo debido a que gran parte de su sistema radicular ha sido destruido por el hongo y las pocas raíces que le

quedan son pequeñas, de color café o negro y quebradizas; esta pudrición suele extenderse desde la corona y la base del tallo y de las hojas inferiores (Agrios, 2006)

Fusarium es un género que involucra muchas especies y formas especiales. Es responsable de marchitamientos en hortalizas, plantas ornamentas, cultivos importantes como el plátano, algodón, tabaco, etc.; además causa cánceres de tallo, pudriciones basales y de raíz (Vargas, 2006).

La fusariosis o roña de la espiga de trigo ataca la planta a partir de la emisión de la espiga, aunque la floración es el estado más susceptible. En México, la especie causal que predomina es *Fusarium graminearum*, pero también están presentes *F. culmorum*, *F. nivale*, *F. equiseti*, *F. avenaceum*, *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. decemnullare*, *F. solani* y *F. oxysporum* (Gilchrist-Saavedra *et al.*, 2005). De las cuales *Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, *F. equisetii*, *F. verticillioides* y *F. proliferatum* son las que tienen mayor incidencia en los municipios productores del Bajío de Guanajuato (CESAVEG, 2013).

Fusarium graminearum Schwabe es una especie que está presente en todo el mundo, causa enfermedades como pudrición de la raíz, pudrición de la corona y roña. Son especialmente severas en los cultivos de trigo en China, sur de Brasil, Argentina y Europa occidental. Su desarrollo se favorece en áreas con inviernos suaves y veranos húmedos y calientes (Zillinsky, 1984; Vargas, 2006). Ocasiono considerables pérdidas de rendimiento de trigo a causa de esterilidad de las florecillas y del llenado deficiente de los granos (Vargas, 2006).

Sus características en medio de cultivo PDA, son que sus colonias crecen rápidamente y producen cantidades relativamente grandes de micelio denso que varían de blanco a naranja pálido a amarillo. Los esporodoquios se producen lentamente después de los 30 días (Leslie y Summerell, 2006)

Los macroconidios raramente están inmersos en un esporodoquio; si están presentes son uniformes en tamaño y forma, delgados y de paredes gruesas con una longitud 25-50×3-4µm, la célula apical es moderadamente curvada y

puntiaguda y en la célula basal bien desarrollada la forma del pie. Esta especie genera de 5 - 6 septas las cuales son bien diferenciadas. Hay ausencia de microconidios y presencia de clamidosporas de rápida formación (Leslie y Summerell, 2006).

Durante muchos años *Fusarium graminearum* se dividió en dos taxones conocidos como Grupo 1 y Grupo 2. Morfológicamente es muy difícil diferenciar los dos grupos, pero estos tienen diferencias ecológicas y patológicas muy importantes. Aoki y O'Donnell describieron la población del Grupo 1 como *F. pseudograminearum* con la población del Grupo 2 reteniendo el nombre original *F. graminearum* y asociado a su teleomorfo *G. zea*. Desde una perspectiva práctica la forma más fácil de distinguir las dos especies es la formación de peritecios. *F. graminearum* es homotálico y la mayoría de las cepas producirán peritecios en casi cualquier medio de cultivo. *F. pseudograminearum* es heterotálico y sus esporas purificadas en medios de cultivo no pueden formar peritecios (Leslie y Summerell, 2006).

Carter *et al.* (2002) identificaron tres grupos diferentes, denominados "A", "B" y "C" de Europa, Nepal y Estados Unidos, y Desjardins *et al.* (2004) identificaron tres grupos de Nepal, pero aún no se conoce como estos grupos se relacionan con los linajes descritos por O'Donnell. O'Donnell *et al.* (1998) y Ward *et al.* (2000) identificaron nueve linajes filogenéticos de *F. graminearum* que pueden ser resueltos por una secuenciación de los genes seleccionados (Leslie y Summerell, 2006).

Los cultivos de *F. graminearum* se pueden confundir fácilmente con *F. pseudograminearum*, *F. crookwellense* y *F. culmorum* y las especies de la sección *Sporotrichiella*, por ejemplo, *F. sporotrichioides*, *F. tricinctum*, *F.* y *F. poae chlamydosporum*. Las diferencias morfológicas son en los macroconidios que permiten la diferenciación de *F. graminearum* de *F. culmorum* y *F. crookwellense*. La ausencia de los microconidios que distingue a los aislamientos de *F. graminearum* de los aislamientos de los miembros de la Sección *Sporotrichiella*

que forman colonias en PDA similares a los de *F. graminearum* (Leslie y Summerell, 2006).

La mayoría de los aislamientos forman peritecios abundantemente en la naturaleza y la liberación de ascosporas que causan enfermedades en las partes aéreas de las plantas como la Fusariosis de la espiga (roña) en trigo (Gilbert *et al.*, 2004; Goswami *et al.*, 2004), en cebada (Mathre, 1997), en avena (Tekauz *et al.*, 2004), en arroz (Nyvall *et al.*, 1999), tallo y pudrición de la mazorca del maíz (White, 1999), el moho del grano de sorgo (Menkir *et al.*, 1996).

La temperatura óptima para la formación de peritecios es 29 °C, más alta que la temperatura máxima 26 °C a la que se liberan las ascosporas (Tschanz *et al.*, 1976). Las ascosporas y los macroconidios puede iniciar eficazmente la infección en las plantas, pero la germinación de ascosporas y macroconidios depende de la humedad ya que las ascosporas son capaces de germinar a una humedad relativa más baja que los macroconidios (Leslie y Summerell, 2006).

Líneas de trigo y cebada también varían en su sensibilidad a *F. graminearum*, pero las cepas no siempre pueden ser diferenciados en función de su agresividad hacia trigo (Xue *et al.*, 2004). La producción tricotecena es un carácter importante para la virulencia y para la propagación del hongo dentro de una cabeza de trigo infectado (Langevin *et al.*, 2004).

Los síntomas se observan primero como un blanqueado prematuro, la infección del raquis puede causar que la espiga entera se blanquee desde el punto de infección, que puede progresar hacia el pedúnculo. Da lugar a micelio rosado o anaranjado y esporodoquios (Vargas, 2006).

Fusarium culmorum (W.G. Smith) Saccardo es una especie que se encuentra ampliamente distribuida y parece que sobrevive a mayores extremos tanto de sequías como de heladas que *F. graminearum*. Los mismos síntomas son producidos por ambas especies. Este patógeno ataca a la raíz de los cereales cultivados en el noroeste de los Estados Unidos de América, Europa Occidental y algunas áreas altas de los subtrópicos (Zillinsky, 1984; Vargas, 2006).

F. culmorum crece rápidamente en medio de cultivo PDA produciendo abundantes esporodoquios en una gran masa de esporas (1 a 2 cm de diámetro), que inicialmente es de color naranja pálido, pero se vuelve marrón a marrón oscuro con el paso de los días. Anillos de masas de esporas se pueden formar de algunos aislamientos bajo condiciones alternas de luz y temperatura. La mayoría de las cepas forman pigmentos rojos en medios de cultivo de Agar, pero algunos pueden tener micelio color marrón olivo y pigmento marrón en el agar (Leslie y Summerell, 2006).

Los esporodoquios son de naranja a color marrón y relativamente comunes, los macroconidios son robustos, relativamente cortos con paredes gruesas, la parte más amplia es en el punto medio del macroconidio. Su lado dorsal es algo curvada y la parte ventral es casi recta, muy amplia con relación a su longitud, la célula apical es redondeada y la célula basal ligeramente puntiaguda y sin una clara forma del pie, genera de 3 a 4 septas, miden de 30-60µm × 4-7µm. Genera abundantes esporodoquios y en estos los macroconidios generalmente son uniformes en forma y tamaño. No se forman microconidios pero sí clamidosporas que se forman en relativa rapidez de 3-5 semanas en medios de cultivo CLA (Leslie y Summerell, 2006).

F. culmorum se puede confundir con *F. sambucinum* o *F. crookwellense*, aunque haya sido aislado de hospedantes y regiones climáticas similares. La célula apical de *F. culmorum* por lo general es redondeada, pero en algunos aislamientos es ligeramente papilada, y es aquí cuando puede dar lugar a la confusión de *F. sambucinum*. La tasa de crecimiento relativamente rápida de *F. culmorum* lo distingue de *F. sambucinum*, que crece lentamente (Leslie y Summerell, 2006).

F. culmorum se distingue de *F. crookwellense* por la forma de los macroconidios. Los macroconidios de *F. crookwellense* son más largos, tienen una forma de pie distinta en las células basales, y la célula apical es estrecha mientras que los macroconidios de *F. culmorum* son cortos, y la célula basal tiene ausencia de la forma de pie o es amorfa de este. Filogenéticamente, *F. culmorum* está más estrechamente relacionado con *F. graminearum* y *F. crookwellense* (Mulè et al.,

2004). El estado sexual del *F. culmorum* probablemente es heterotálico (Kerényi & Hornok, 2002). Además de diferencias basadas en ADN, estas especies también se pueden distinguir por sus perfiles de metabolitos secundarios (Thrane, 1990).

F. culmorum es más común en las regiones de zonas templadas, y con frecuencia se asocia a la pudrición del pie en cereales y enfermedades de la espiga, sobre todo en las partes frías de Europa. Interacciones entre *F. culmorum* y El Virus del Enanismo Amarillo de la cebada puede intensificar los síntomas de la enfermedad (Koch y Huth, 1997). Las plantas con presencia de la enfermedad en la espiga generan granos infectados, pero estos granos enfermos no son responsables de la transmisión de la enfermedad en condiciones de campo (Gilbert *et al.*, 2003). La importancia de este hongo como una causante de la fusariosis de la espiga de trigo puede estar disminuyendo, sin embargo, *F. graminearum* se está convirtiendo en la causa más común observada de esta enfermedad (Waalwijk *et al.*, 2003). Aunque *F. culmorum* es un patógeno del suelo puede dispersarse por salpique a las partes aéreas de las plantas de trigo y cebada, donde puede causar síntomas de tizón de la espiga y colonizar el grano ampliamente (Jackowiak *et al.*, 2005).

Aunque no hay ningún estado sexual conocido de *F. culmorum*, análisis poblacionales sugieren que la recombinación es parte importante del ciclo de vida de este hongo (Toth *et al.*, 2004). Hoy en día se encuentran primers y protocolos disponibles para su uso en análisis de poblaciones de este hongo para detectar *F. culmorum* a través de ensayos de PCR en tiempo real (Waalwijk *et al.*, 2004).

Fusarium equiseti (Corda) Saccardo es una especie que se presenta frecuentemente como un hongo del suelo, constituyendo una alta proporción de la microflora en algunas áreas. Sin embargo, no se considera como un patógeno serio de los cultivos cerealícolas (Zillinsky, 1984; Vargas, 2006).

Las características morfológicas en medio PDA son micelio abundante que inicialmente es de color blanco, pero se convierte en marrón con el paso del tiempo, se pueden formar esporodoquios en una masa de esporas central, pero puede no ser obvio puesto que pueden ser oscurecidos por el micelio. Las masas

de espora puede ser de color naranja pálido a marrón oscuro y zonificaciones anulares pueden desarrollarse en respuesta a un ciclo de luz-oscuridad (Leslie y Summerell, 2006).

Esta especie forma un pigmento marrón pálido a marrón oscuro en contacto con medios de cultivo de Agar. Manchas de color marrón oscuro o manchas de pigmento por lo general se forman en el agar (Leslie y Summerell, 2006).

Los esporodoquios son color naranja. Los macroconidios en los esporodoquios por lo general son uniformes en forma y tamaño y deben ser utilizados para fines de identificación de este hongo. Estos macroconidios son largos o muy largos y delgados. Los macroconidios han formado una curvatura dorsiventral típica. La célula apical es cónica y alargada o incluso llega a tener forma de látigo. La célula basal tiene una forma de pie prominente que puede ser alargada en apariencia. Genera de 5 - a 7 septas midiendo de 50-100µm x 3.5-6.0µm. Esta especie genera abundantes esporodoquios (Leslie y Summerell, 2006).

F. equiseti no forma microconidios. Nelson *et al.* (1983) señaló que algunos aislamientos de *F. equiseti* producen microconidios pero estos autores también incluyeron *F. scirpi* en su definición de *F. equiseti*. Existe abundancia de clamidosporas y velocidad en su formación generalmente de 2-6 semanas en medios de cultivo CLA, localizadas en hifas aéreas e hifas en el agar, las cuales pueden estar en cadenas o individuales con pigmentos marrones y paredes gruesas verrugosas con el tiempo (Leslie y Summerell, 2006).

F. equiseti se puede confundir con otras especies de *Fusarium*. Nelson *et al.* (1983) incluyó *F. scirpi* en su descripción de *F. equiseti*, con Burgess *et al.* *F. equiseti* se confunde más fácilmente con *F. compactum* (cepas pigmentadas de color marrón), y *F. semitectum*, con *F. scirpi*. *F. compactum* y *F. equiseti* se distinguen en la tasa de crecimiento en PDA. *F. scirpi* produce abundantes microconidios en polifialides mientras que *F. equiseti* no produce microconidios. *F. semitectum* produce abundantes macroconidios en forma de huso en polifialides que nunca se ven en cultivos de *F. equiseti*. Algunos aislamientos producen

mucho macroconidios con una célula apical filamentosa o en forma de látigo y pueden parecerse al macroconidios formado por *F. longipes*. Los cultivos de *F. longipes* en medios PDA producen pigmento rojo. Mientras que los cultivos de *F. equiseti* en PDA producen pigmento marrón. *F. equiseti* puede ser una especie compleja pero se necesitan datos moleculares para probar posibilidades rigurosas (Leslie y Summerell, 2006).

F. equiseti es un habitante del suelo cosmopolita y es efectivo en colonizar las raíces de plantas en unas temperaturas que van de 13 °C a 30 °C (Saremi *et al.*, 1999). Como colonizador raíz puede reducir o prevenir la asociación de un hongo micorriza con la raíz. *F. equiseti* es especialmente común en las zonas más secas, por ejemplo, Bahrain (Mandeel, 1996) o Israel (Joffe y Palti, 1977), aunque también puede ser encontrado en suelos cerca del Círculo Polar Ártico (Kommedahl *et al.*, 1988). Esta especie es un colonizador común de senescentes o tejido vegetal dañado. No es inusual aislar a *F. equiseti* de material de trigo enfermo, sin embargo, los registros de *F. equiseti* como un patógeno deben ser tratados con precaución (Leslie y Summerell, 2006).

Fusarium verticillioides (Saccardo) Nirenberg es un patógeno asociado a maíz y trigo, se encuentra en el suelo colonizando y es de distribución cosmopolita; las características en medio PDA son micelio blanco con pigmentos violetas conforme pasa el tiempo; en el caso de medio de cultivo Agar la pigmentación varía desde nula a grisácea o incluso de naranja a violeta oscuro. Forma esclerocios azul-negro que se pueden desarrollar en algunos aislamientos pero no es razón cual para determinar a la especie (Leslie y Summerell, 2006).

Los esporodoquios pueden ser de coloración marrón o de color naranja y estar aisladas como una masa de micelio y conidios. Los macroconidios son largos y esbeltos ligeramente falcados o rectos de paredes delgadas, típicos del complejo de especies *G. fujikuroi*. La célula apical es curva y a menudo terminado en un punto, la morfología de la célula basal es entallada o en forma de pie, forman de 3-5 septas, pero su abundancia varía según el aislamiento (Leslie y Summerell, 2006). Estos miden de 29.2 – 31 µm x 2.9 – 3.7 µm (Morales *et al.*, 2006).

Los microconidios son ovales y aplanados y generalmente no tienen septas (Leslie y Summerell, 2006). Miden de $11.8 - 12 \mu\text{m} \times 1.5 - 2.5 \mu\text{m}$ (Morales *et al.*, 2006).

Se producen cadenas de microconidios en monofialides (Morales *et al.*, 2006) que en ocasiones se forman en parejas como apariencia de oreja de conejo, con abundante micelio aéreo y sin producción de clamidosporas aunque en algunos casos se pueden formar células hinchadas en las hifas que fácilmente pueden ser confundidas con clamidosporas y que algunos autores denominan pseudoclamidosporas (Leslie y Summerell, 2006).

Ha habido una gran controversia respecto a la denominación de este taxón dado que algunos taxónomos lo llaman *F. moniliforme* y otros *F. verticillioides*. El nombre de *F. verticillioides* tiene prioridad y es ahora generalmente aceptado y es el nombre que se debe utilizar para esta especie (Seifert *et al.*, 2003).

F. verticillioides es morfológicamente idéntica a las cepas de *F. thapsinum* que no producen el diagnóstico del pigmento amarillo. *F. verticillioides* es también similar a *F. proliferatum*, pero esta última especie se distingue por su capacidad para formar cadenas de microconidios de polifialides. Las cadenas de microconidios producidos por *F. proliferatum* por lo general son más cortos que los de *F. verticillioides* y *F. thapsinum*. *F. verticillioides* y *F. thapsinum* pueden ser fácilmente diferenciados únicamente por el uso de pruebas moleculares (Leslie y Summerell, 2006).

F. verticillioides es también muy similar a *F. andiyazi*, pero ésta no forma pseudoclamidosporas. *F. verticillioides* produce células hinchadas que se confunden fácilmente con pseudoclamidosporas (Leslie y Summerell, 2006).

F. verticillioides es similar en algunos aspectos a *F. nygamai* que forma microconidios en cadenas cortas en monofialides (Burgess y Trimbol., 1986). *F. nygamai*, sin embargo, forma abundantes macroconidios en esporodoquios y clamidosporas en las hifas aéreas en aislamientos de tiempo sembradas en medios de cultivo. Las cepas que son morfológicamente similares y filogenéticamente relacionadas con *F. verticillioides* han sido aislados de plátano,

pero estas cepas no forman fumonisinas (Moretti *et al.*, 2004). Ya sea que estas cepas representan una subpoblación aislada de *F. verticillioides* o están en su lugar endémico y una nueva especie queda por determinar (Hirata *et al.*, 2001).

Las conidios se producen en los fiálides a través de un proceso enteroblastico en el que la pared interior del conidio y la fialide son continuas y así se añadan capas exteriores. Este proceso reduce la cantidad de material disponible para bloquear la aberturas de las fialides y puede ser una de las razones por las que las cadenas de *F. verticillioides* son tan largas. La forma y el espesor de la cadena formada por la fialide durante la producción de conidios puede ser útil para los propósitos taxonómicos, pero este rasgo es difícil de usar y no ha sido ampliamente examinado ni evaluado (Tiedt y Jooste, 1988).

F. verticillioides se distribuye ampliamente por todo el mundo, y es particularmente asociado con maíz donde puede causar la pudrición del tallo y la pudrición de la mazorca que dan lugar a pérdidas significativas de rendimiento y reducciones de la calidad del grano. La gravedad de la enfermedad se ve afectada por la forma y por el momento de la inoculación (Leslie y Summerell, 2006).

Bacon y Nelson (1994) citan una prueba de patogenicidad para plántulas, ya que este hongo puede también causar la putrefacción de semillas de granos infestados cuando se plantan. *F. verticillioides* pueden entrar sistémicamente en las plantas de maíz a partir de la semilla y a través heridas en la plantas. Aunado a esto el estrés hídrico aumenta la cantidad de la pudrición del tallo y se solucionar, al menos en parte, por el riego (Leslie y Summerell, 2006). *F. verticillioides* puede causar pudrición de la raíz y la disminución de crecimiento de la raíz en plántulas de maíz y trigo (Soonthornpocht *et al.*, 2000).

El hongo suele aparecer en los granos de maíz y trigo cuando se acercan a la madurez fisiológica y sigue aumentando hasta el final de la temporada de crecimiento (Young y Kucharek, 1977). El efecto de la transmisión por semilla de *F. verticillioides* en la germinación y el rendimiento es un tema de debate, pero

parece depender en gran medida de las condiciones bajo las cuales se produce la germinación y el crecimiento posterior (Leslie y Summerell, 2006).

El hongo se encuentra como un endófito en variedades de trigo y maíz, donde puede tener función de protección hacia otros hongos (Wicklow *et al.*, 1988). La proporción de infección asintomática en los granos de maíz y trigo pueden depender del genotipo del huésped. *F. verticillioides* se adapta bien a la dispersión del aire y el viento y puede infectar el grano del huésped a través de las sedas de la mazorca o a través de heridas creadas por las larvas de Lepidópteros (Sobek y Munkvold, 1999). *F. verticillioides* persiste en residuos de cosecha o en la superficie del suelo o en el mismo suelo después de la incorporación mecánica y puede sobrevivir por hasta 630 días con condiciones idóneas de campo y un máximo de 900 días en un lugar fresco y seco (Liddell y Burgess, 1985). La reducción de la labranza aumenta la cantidad del inóculo de *F. verticillioides* disponible para la siguiente temporada. Tanto el hongo *Trichoderma* y la bacteria *Pseudomonas* tienen potencial para servir como agentes de control biológico de *F. verticillioides* (Bacon *et al.*, 2001).

Fusarium proliferatum (Matsushima) Nirenberg es una especie que está distribuida en todo el mundo y ataca un gran número de plantas agrícolas y no agrícolas, pero es importante en cereales como trigo, maíz y sorgo. Su fase sexual pertenece a la especie *G. intermedia* (Kuhlman) Samuels, Nirenberg y Seifert (Leslie y Summerell, 2006).

Las características morfológicas en medio de cultivo PDA demuestran abundante micelio aéreo inicialmente de color blanco que con el paso del tiempo llega a ser color púrpura-violeta. Los esporodoquios pueden estar presentes como masas discretas en la colonia fungal. En medio de cultivo Agar se producen pigmentos violetas, los esclerocios de color azul o negro se pueden desarrollar en algunos aislamientos pero estos no son indicativos de diagnóstico (Leslie y Summerell, 2006).

Los esporodoquios son producidos con frecuencia o en su defecto pueden ser difíciles de encontrar son de color pálido a un naranja tenue, los macroconidios son alargados de paredes delgadas y son típicos del complejo de especies de *G. fujikuroi*. La célula apical es curvada y la célula basal está mal desarrollada generando de 3-5 septas, los macroconidios varían de un medio de cultivo a otro, es por eso que para la localización de estas estructuras es necesaria la búsqueda en medios de cultivos frescos y que no hayan sido propagados para su conservación. Los macroconidios miden de 24.23 – 32.60 μm \times 1.96 – 2.44 μm (Leslie y Summerell, 2006).

En el caso de los microconidios tienen forma de tabique con la base aplanada, y no tienen septas, en algunos aislamientos se pueden encontrar microconidios piriformes pero estos son raros (Leslie y Summerell, 2006). Estos microconidios se encuentran en cadena pero generalmente más cortos que los producidos por *F. verticillioides*, pero al contrario de estos, aquí se encuentran en polifialides, ya que esta característica es base para la distinción entre estas dos especies, los microconidios tienen medidas que van de 4.44 – 12.9 μm \times 1.44 – 2.55 μm (Leslie y Summerell, 2006).

F. proliferatum fue descrito por primera vez como *Cephalosporium* por Matsushima en 1971 y se describía en las especies de *Fusarium* por Nirenberg en 1976. Debido al trabajo de Nirenberg la mayoría de los aislamientos de *F. proliferatum* probablemente habrían sido identificados como *F. moniliforme*, y gran parte de la investigación sobre *F. proliferatum* hubiera sido anexada y ser inseparable de la de *F. moniliforme* (Leslie y Summerell, 2006).

F. proliferatum es más probable que se confunda con *F. fujikuroi*, *F. oxysporum*, *F. thapsinum* y *F. verticillioides*. Morfológicamente *F. proliferatum* y *F. fujikuroi* no se pueden diferenciar eficazmente en la morfología dado que son especies hermanas. Por lo general, pero no siempre, se pueden diferenciar mediante el uso de pruebas de apareamiento o secuencias de ADN (Leslie *et al.*, 2004).

Cultivos de *F. proliferatum* y *F. oxysporum* a menudo parecen similares, pero estas especies se distinguen fácilmente por la presencia de las microconidias en cadenas para *F. proliferatum* y la presencia de clamidosporas y microconidios en falsas cabezas de *F. oxysporum*. *F. proliferatum* puede ser diferenciada de *F. thapsinum* y *F. verticillioides* por la presencia de polifialides y cadenas más cortas de los microconidios (Leslie y Summerell, 2006).

Las diferencias morfológicas entre *F. proliferatum*, *F. subglutinans* y *F. verticillioides* se puede realizar en el método de Culturing on minimal médium reportado por Clear y Patrick en 1992, el cual menciona utilizar sacarosa al 20% en lugar de 3% y en el caso de CLA utilizar 4-8 g / l KCl y con esto puede ser útil para la identificación de *F. proliferatum* (Fisher *et al.*, 1983).

Se ha informado de un crecimiento micelial máximo de *F. proliferatum* a una temperatura de 25 °C y un potencial osmótico de -1,0 MPa (Nelson *et al.*, 1990). Antioxidantes comercialmente disponibles pueden ser utilizados para tratar el crecimiento del grano y respecto a *F. proliferatum* reducir la cantidad de fumonisinas producidas *in situ*. Los conidios germinan de manera óptima a 30 °C (Marin, *et al.*, 1996).

F. proliferatum puede persistir en los rastrojos de tallos de maíz y trigo, ya sea en la superficie del suelo o enterradas en un campo durante al menos 21 meses (Cotten y Munkvold, 1998). La inyección de una suspensión de esporas a través de hojas de maíz en la fase de cogollo se puede utilizar para diferenciar líneas de maíz que son resistentes / susceptibles a la pudrición de la mazorca por *Fusarium* (Clements *et al.*, 2003).

F. proliferatum se ha colectado de numerosos entornos en todo el mundo. Es uno de los causantes de la pudrición de tallo de trigo y la pudrición de la mazorca del maíz (White, 1999); múltiples cepas que son genéticamente distintas de *F. proliferatum* se puede colectar de una sola planta de maíz (Kedera *et al.*, 1994). El maíz híbrido "BT", que es menos susceptible al barrenador europeo del maíz *Ostrinia nubilalis*, tuvo un menor nivel de infección con *F. proliferatum* que los

comparables sin el transgén (Munkvold *et al.*, 1997). *F. proliferatum* puede ser endofítico en el trigo (Bishop, 2002), y altera la respuesta de defensa en las plantas (Bishop *et al.*, 2002).

CAPITULO I. ETIOLOGIA DE LA ESPIGA BLANCA Y PUDRICIÓN DE RAÍZ DE TRIGO (*Triticum aestivum* L.) EN EL BAJÍO, MÉXICO

Hans Errol **Vega-Portillo**¹, Gerardo **Leyva-Mir**¹, Mateo **Vargas-Hernandez**¹, Omar G. **Alvarado-Gómez**² Héctor Eduardo **Villaseñor-Mir**³

¹Protección Vegetal, Universidad Autónoma Chapingo. ² Universidad Autónoma de Nuevo León ³ INIFAP-CEVAMEX.

RESUMEN

En el año 2012 se colectaron plantas de trigo de la variedad Cortázar S94, en la localidad de Tepetate de Negrete, municipio de Pénjamo, Guanajuato, con la finalidad de identificar el o los agentes causales de la espiga blanca y la pudrición de raíz de trigo. Se realizaron análisis del sitio de muestreo y métodos de identificación como caracterización morfológica y postulados de Koch. Mediante la caracterización morfológica se logró aislar hongos presentes en la raíz de trigo como *Fusarium graminearum* y *F. proliferatum* sembrados en medio de cultivo PDA y A.A., teniendo incidencias de 40% y 65% respectivamente. Dado lo anterior se infiere que la fusariosis de la espiga y de la raíz de trigo está siendo causada por las especies de mayor presencia que son *F. proliferatum* y *F. graminearum*. Se realizaron inoculaciones a semillas de trigo de 28 variedades susceptibles a la fusariosis para observar necrosamiento de raíz y a partir de ese síntoma poder reaislar el patógeno y comprobar los agentes causales de la pudrición de raíz de trigo y espiga blanca. Las incidencias del 4to postulado de Koch de 40% y 85% para *F. graminearum* y *F. proliferatum* respectivamente, con esto último se comprobó que estas especies son las que se encuentran con mayor incidencia en la zona de Pénjamo Guanajuato y causan los síntomas de espiga blanca y pudrición de raíz en trigo.

SUMMARY

In 2012 wheat plants of Cortazar S94 variety were collected in Tepetate de Negrete, Guanajuato, with the objective of identify the causal agent (s) of the white tassel and the wheat root rotting. Different identifying methods were realized, like morphologic characterization, Koch postulated, electronic microscopy and PCR. Throughout the morphologic characterization it was successful isolated the fungus into the wheat roots like *Fusarium graminearum* and *F. proliferatum*, fungus were seed in a culture PDA and AA, it has incidences of 40% and 65% respectively. Due the preceding results, the fusariosis on the tassel and root is caused by the species with more presence; they are *F. proliferatum* and *F. graminearum*. It was realized inoculations on 28 varieties of wheat seeds susceptible to the fusariosis to observe wheat necrosis and starting from this symptom re-isolated the pathogen and prove the cause agents of root rotting and white tassel. The incidences 4° Koch Postulated of 40% and 85% for *F. graminearum* and *F. proliferatum* respectively, with this final result it could prove, this specie is most finding in the zone of Penjamo, Guanajuato and it is cause of the symptoms of white tassel and root rotting wheat.

INTRODUCCION

Fusarium es un género que involucra muchas especies y formas especiales. Es responsable de marchitamientos en hortalizas, plantas ornamentales, cultivos importantes como el plátano, algodón, tabaco, etc.; además causa cánceres de tallo, pudriciones basales y de raíz (Vargas *et al.*, 2006).

La fusariosis o roña de la espiga de trigo ataca la planta a partir de la emisión de la espiga, aunque la floración es el estado más susceptible. En México, la especie causal que predomina es *Fusarium graminearum*, pero también están presentes *F. culmorum*, *F. nivale*, *F. equisetii*, *F. avenaceum*, *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. decemcellulare*, *F. solani* y *F. oxysporum* (Gilchrist *et al.*, 2005). De las cuales *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. equisetii*, *F. verticillioides* y *F. proliferatum* son las que tienen mayor incidencia en los municipios productores del Bajío de Guanajuato (CESAVEG, 2013).

F. graminearum Schwabe es una especie que está presente en todo el mundo, causa enfermedades como pudrición de la raíz, pudrición de la corona y roña. Son especialmente serias en los cultivos de trigo en China, sur de Brasil, Argentina y Europa occidental. Su desarrollo se favorece en áreas con inviernos suaves y veranos húmedos y calientes (Zillinsky, 1984; Vargas, 2006).

Los macroconidios de esta especie, son uniformes en tamaño, forma, delgados y de paredes gruesas con una longitud 25-50 × 3-4µm; la célula basal está bien desarrollada en forma de pie y la célula apical es moderadamente curvada y puntiaguda. Esta especie genera de 5 - 6 septas las cuales son bien diferenciadas. Hay ausencia de microconidios y presencia de clamidosporas de rápida formación (Leslie y Summerell, 2006).

Los peritecios de *F. graminearum* se desarrollan de manera óptima a 29 °C, esta temperatura es más alta que la temperatura máxima 26 °C a la que se liberan las ascosporas (Tschanz *et al.*, 1976). La infección en las plantas puede ser iniciada por las ascosporas y los macroconidios, pero la germinación de ascosporas y macroconidios depende de la humedad ya que las ascosporas son capaces de

germinar a una humedad relativa más baja que los macroconidios (Leslie y Summerell, 2006).

F. culmorum (W.G. Smith) Saccardo es una especie que se encuentra ampliamente distribuida y parece que sobrevive a mayores valores tanto de sequías como de heladas que *F. graminearum*. Los mismos síntomas son producidos por ambas especies. Este patógeno ataca a la raíz de los cereales cultivados en el noroeste de los Estados Unidos de América, Europa Occidental y algunas áreas altas de los subtrópicos (Zillinsky, 1984; Vargas, 2006).

Los esporodoquios son de naranja a color marrón y relativamente comunes, los macroconidios son robustos, relativamente cortos con paredes gruesas, la parte más amplia es en el punto medio del macroconidio. Su lado dorsal es algo curvada y la parte ventral es casi recta, muy amplia con relación a su longitud, la célula apical es redondeada y la célula basal ligeramente puntiaguda y sin una clara forma del pie, genera de 3 a 4 septas, miden de 30-60 μm por 4-7 μm . Genera abundantes esporodoquios y en estos los macroconidios generalmente son uniformes en forma y tamaño. No se forman microconidios pero si clamidosporas que se forman en relativa rapidez de 3-5 semanas en medios de cultivo CLA (Leslie y Summerell, 2006).

F. culmorum es más común en las regiones de zonas templadas, y con frecuencia se asocia a la pudrición del pie en cereales y enfermedades de la espiga, sobre todo en las partes frías de Europa. Interacciones entre *F. culmorum* y El Virus del Enanismo Amarillo de la cebada puede intensificar los síntomas de la enfermedad (Koch *et al.*, 1997).

F. equiseti (Corda) Saccardo es una especie que se presenta frecuentemente como un hongo del suelo, constituyendo una alta proporción de la microflora en algunas áreas. Sin embargo, no se considera como un patógeno serio de los cultivos cerealícolas (Zillinsky, 1984; Vargas, 2006).

Los esporodoquios son color naranja. Los macroconidios en los esporodoquios por lo general son uniformes en forma y tamaño y deben ser utilizados para fines de

identificación de este hongo. Estos macroconidios son largos o muy largos y delgados. Los macroconidios han formado una curvatura dorsiventral típica. La célula apical es cónica y alargada o incluso llega a tener forma de látigo. La célula basal tiene una forma de pie prominente que puede ser alargada en apariencia. Genera de 5 - a 7 septas midiendo de 50-100µm × 3.5-6.0µm. Esta especie genera abundantes esporodoquios (Leslie y Summerell, 2006).

F. equiseti es un habitante del suelo cosmopolita y es efectivo en colonizar las raíces de plantas en unas temperaturas que van de 13 ° C a 30 ° C (Saremi *et al.*, 1999). Como colonizador raíz puede reducir o prevenir la asociación de un hongo micorrizico con la raíz. *F. equiseti* es especialmente común en las zonas más secas, por ejemplo, Bahrain (Mandeel,1996) o Israel (Joffe *et al.*, 1977), aunque también puede ser encontrado en suelos cerca del Círculo Polar Ártico (Kommedahl *et al.*, 1988). Esta especie es un colonizador común de senescentes o tejido vegetal dañado. No es inusual aislar a *F. equiseti* de material de trigo enfermo, sin embargo, los registros de *F. equiseti* como un patógeno deben ser tratados con precaución (Leslie y Summerell, 2006).

F. verticillioides (Saccardo) Nirenberg es un patógeno asociado a maíz y trigo, se encuentra en el suelo colonizando y es de distribución cosmopolita, las características en medio PDA son micelio blanco con pigmentos violetas conforme pasa el tiempo, en el caso de medio de cultivo Agar la pigmentación varía desde nula a grisácea o incluso de naranja a violeta oscuro. Forma esclerocios azul-negro que se pueden desarrollar en algunos aislamientos pero no es razón cual para determinar a la especie (Leslie y Summerell, 2006).

Los esporodoquios pueden ser de coloración marrón o de color naranja y estar aisladas como una masa de micelio y conidios. Los macroconidios son largos y esbeltos ligeramente falcados o rectos de paredes delgadas, típicos del complejo de especies *G. fujikuroi*. La célula apical es curva y a menudo terminado en un punto, la morfología de la célula basal es entallada o en forma de pie, forman de 3-5 septas, pero su abundancia varía según el aislamiento (Leslie y Summerell, 2006). Estos miden de 29.2 – 31 µm × 2.9 – 3.7 µm. Los microconidios son ovales

y aplanados y generalmente no tienen septas (Leslie y Summerell, 2006). Miden de 11.8 – 12 μm \times 1.5 – 2.5 μm (Morales *et al.*, 2006).

Se producen cadenas de microconidios en monofialides (Morales *et al.*, 2006) que en ocasiones se forman en parejas como apariencia de oreja de conejo, con abundante micelio aéreo y sin producción de clamidosporas aunque en algunos casos se pueden formar células hinchadas en las hifas que fácilmente pueden ser confundidas con clamidosporas y que algunos autores denominan pseudoclamidosporas (Leslie y Summerell, 2006)

F. verticillioides se distribuye ampliamente por todo el mundo, y es particularmente asociado con maíz donde puede causar la pudrición del tallo y la pudrición de la mazorca que dan lugar a pérdidas significativas de rendimiento y reducciones de la calidad del grano. La gravedad de la enfermedad se ve afectada por la forma de inoculación y por tanto el momento de la inoculación (Leslie y Summerell, 2006)

F. proliferatum (Matsushima) Nirenberg es una especie que está distribuida en todo el mundo y ataca un gran número de plantas agrícolas y no agrícolas, pero es importante en cereales como trigo, maíz y sorgo. Su fase sexual pertenece a la especie *G. intermedia* (Kuhlman) Samuels, Nirenberg & Seifert (Leslie y Summerell, 2006)

Las características morfológicas en medio de cultivo PDA demuestran abundante micelio aéreo inicialmente de color blanco que con el paso del tiempo llega a ser color púrpura-violeta. Los esporodoquios pueden estar presentes como masas discretas en la colonia fungal. En medio de cultivo Agar se producen pigmentos violetas, los esclerocios de color azul o negro se pueden desarrollar en algunos aislamientos pero estos no son indicativos de diagnóstico (Leslie y Summerell, 2006).

Los esporodoquios son producidos con frecuencia o en su defecto pueden ser difíciles de encontrar son de color pálido a un naranja tenue, los macroconidios son alargados de paredes delgadas y son típicos del complejo de especies de *G. fujikuroi*. La célula apical es curvada y la célula basal está mal desarrollada

generando de 3-5 septas, los macroconidios varían de un medio de cultivo a otro, es por eso que para la localización de estas estructuras es necesaria la búsqueda en medios de cultivos frescos y que no hayan sido propagados para su conservación. Los macroconidios miden de 24.23 – 32.60 μm \times 1.96 – 2.44 μm (Leslie y Summerell, 2006).

En el caso de los microconidios tienen forma de tabique con la base aplanada, y no tienen septas, en algunos aislamientos se pueden encontrar microconidios piriformes pero estos son raros (Leslie y Summerell, 2006). Estos microconidios se encuentran en cadena pero generalmente más cortos que los producidos por *F. verticillioides*, pero al contrario de estos, aquí se encuentran en polifialides, ya que esta característica es base para la distinción entre estas dos especies, los microconidios tienen medidas que van de 4.44 - 12.9 μm \times 1.44 - 2.55 μm (Leslie y Summerell, 2006).

F. proliferatum fue descrito por primera vez como *Cephalosporium* por Matsushima en 1971 y se describía en las especies de *Fusarium* por Nirenberg en 1976. Debido al trabajo de Nirenberg la mayoría de los aislamientos de *F. proliferatum* probablemente habrían sido identificados como *F. moniliforme*, y gran parte de la investigación sobre *F. proliferatum* hubiera sido anexada y ser inseparable de la de *F. moniliforme* (Leslie y Summerell, 2006).

F. proliferatum es más probable que se confunda con *F. fujikuroi*, *F. oxysporum*, *F. thapsinum* y *F. verticillioides*. Morfológicamente *F. proliferatum* y *F. fujikuroi* no se pueden diferenciar eficazmente en la morfología dado que son especies hermanas. Por lo general, pero no siempre, se pueden diferenciar mediante el uso de pruebas de apareamiento o Secuencias de ADN (Leslie *et al.*, 2004).

Cultivos de *F. proliferatum* y *F. oxysporum* a menudo parecen similares, pero estas especies se distinguen fácilmente por la presencia de los microconidios en cadenas para *F. proliferatum* y la presencia de clamidosporas y microconidios en falsas cabezas de *F. oxysporum*. *F. proliferatum* puede ser diferenciada de *F.*

thapsinum y *F. verticillioides* por la presencia de polifialides y cadenas más cortas de los microconidios (Leslie y Summerell, 2006).

Las diferencias morfológicas entre *F. proliferatum*, *F. subglutinans* y *F. verticillioides* se puede realizar en el método de Culturing on minimal médium reportado por Clear y Patrick 1992, el cual menciona utilizar sacarosa al 20% en lugar de 3% y en el caso de CLA utilizar 4-8 g / l KCl y con esto puede ser útil para la identificación de *F. proliferatum* (Fisher *et al.*, 1983).

Se ha informado de un crecimiento micelial máximo de *F. proliferatum* a una temperatura de 25 °C y un potencial osmótico de -1.0 MPa (Nelson *et al.*, 1990). Antioxidantes comercialmente disponibles pueden ser utilizados para forzar el crecimiento del grano y respecto a *F. proliferatum* reducir la cantidad de fumonisinas producidas *in situ*. Los conidios germinan de manera óptima a 30 °C (Marin *et al.*, 1996).

F. proliferatum puede persistir en los rastrojos de tallos de maíz y trigo, ya sea en la superficie del suelo o enterradas en un campo durante al menos 21 meses (Cotten *et al.*, 1998). La inyección de una suspensión de esporas a través de hojas de maíz en la fase de cogollo se puede utilizar para diferenciar líneas de maíz que son resistentes/susceptibles a la pudrición de la mazorca por *Fusarium* (Clements *et al.*, 2003).

F. proliferatum se ha colectado de numerosos entornos en todo el mundo. Es uno de los causantes de la pudrición de tallo de trigo y la pudrición de la mazorca del maíz (White, 1999), múltiples cepas que son genéticamente distintas de *F. proliferatum* se puede colectar de una sola planta de maíz (Kedera *et al.*, 1994). El maíz híbrido "BT", que es menos susceptible al barrenador europeo del maíz *Ostrinia nubilalis*, tuvo un menor nivel de infección con *F. proliferatum* que los comparables sin el transgén (Munkvold *et al.*, 1997). *F. proliferatum* puede ser endofítico en el trigo, y altera la respuesta de defensa en las plantas (Bishop, 2002).

Debido a la importancia que tienen estas especies de hongos mencionadas en trigo, y siendo este un alimento de gran importancia en el mundo, como fuente de carbohidratos, proteínas, vitaminas y minerales, (SARH, 1992), y que además en México es uno de los cultivos básicos más importantes y ocupa el cuarto lugar en superficie sembrada y el tercero en volumen de producción (Hernández, 1992), es necesario tener un diagnóstico certero de la o las especies que ocasionen los problemas de espiga blanca y necrosis de raíz en trigo en el Bajío.

Los daños que causan los hongos a los granos dependen en gran medida a la severidad del ataque y del hongo que se trate. Si la infección es muy severa prácticamente puede destruir el grano, como frecuentemente sucede con las pudriciones por especies de *Fusarium*, si la infección no es severa el hongo permanece en la semilla sin afectarla aparentemente, y ésta es la forma en la que un hongo es transmitido por semilla de un ciclo agrícola a otro (Vargas, 2006; Moreno, 1996).

La roña (tizón de la espiga, moho rosa, espiga blanca) se expresa en la muerte prematura o tizón de las espiguillas. La enfermedad es especialmente importante en lugares húmedos. La esterilidad de flores y el deficiente llenado de la semilla resultan en la reducción de cosechas. El hongo causal perteneciente al género *Fusarium spp*, es un parasito facultativo no específico, que puede infectar varias partes de la planta, por lo que el tizón de la espiga puede coincidir con infecciones de la raíz o de la hoja, o estar asociado con otros organismos que atizonan espigas. Estos hongos tienen requerimientos nutrimentales simples y son saprofitos omnipresentes (SARH, 1992).

OBJETIVOS

1. Identificar la o las especies del género *Fusarium spp.* involucrados en la pudrición de raíz y espiga blanca del trigo.
2. Evaluar el efecto de la inoculación con patógenos del género *Fusarium spp.*, en 28 diferentes variedades de trigo.

HIPOTESIS

1. Las especies *Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, *F. equisetii*, *F. verticillioides* y *F. proliferatum*, son las que mayor incidencia tienen en el área de Pénjamo, Guanajuato, por lo que se considera que alguna de estas especies está causando los síntomas de espiga blanca y pudrición de raíz en trigo.
2. La inoculación con patógenos del género *Fusarium*, sobre las 28 variedades de trigo afectan algunas características como porcentaje de germinación, porcentaje de necrosis en raíz, longitud de raíz y longitud de follaje.
3. Las variedades empleadas presentan una susceptibilidad o tolerancia específica diferente a la inoculación de patógenos del género *Fusarium spp.*

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de muestreo

La localidad de Tepetate de Negrete está situada en el Municipio de Pénjamo en el Estado de Guanajuato, México. Tiene 298 habitantes, esta localidad se encuentra a 1700 metros de altitud.

En la región el clima es templado, la temperatura máxima es de 34°C, la mínima de 4.6°C y la media anual de 20.2°C. y la precipitación pluvial es de 670 mm anuales.

En el año 2012 se recolectaron plantas de trigo de la variedad Cortázar S96 con síntomas de espiga blanca y pudrición de raíz en la localidad mencionada.

Aislamiento

Las plantas colectadas en el 2012 en el sitio de muestreo con síntomas de espiga blanca y pudrición de raíz, se lavaron con agua corriente para facilitar la evaluación de las lesiones de la raíz y así poder eliminar el exceso de suelo; una vez limpias las raíces se cortaron fragmentos de 0.5 cm, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1.5% durante tres minutos, se les dio un triple lavado con agua destilada estéril bajo condiciones asépticas y en presencia de un mechero de Bunsen (Schaad *et al.*, 2002).

Preparación de PDA

Se realizó la preparación de medios de cultivo PDA, utilizando 200 gramos de papa, 20 gramos de dextrosa y 15 gramos de agar; la papa se cocinó en una olla de presión a 15 lb por 15 minutos y el jugo resultante se mezcló con la dextrosa y el agar y se aforó a un litro (Marin *et al.*, 1996).

Una vez desinfectados los fragmentos de raíz se colocaron en cajas Petri con medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) con 50 mgL^{-1} de sulfato de estreptomicina (SIGMA), para evitar el crecimiento de bacterias. Las cajas fueron monitoreadas cada 24 horas para observar el tipo de crecimiento micelial a una temperatura de $28 \text{ }^\circ\text{C}$ bajo condiciones de luz. (Marin *et al.*, 1996).

Purificación

Las cajas con micelio de buen crecimiento fueron utilizadas para ser transferidas a nuevas cajas de PDA con el propósito de incrementar y purificar al patógeno. Para este mismo fin, se tomaron bajo el microscopio estereoscópico, trocitos de agar que contenían micelio en punta de hifa, para ser transferido a una nueva caja Petri con PDA y así obtener una cepa pura. (Hernández, 1992)

Identificación morfológica

Del aislamiento purificado en el punto anterior, se realizaron transferencias y se tomaron cajas que contenían micelio del mismo color y del mismo hábito de crecimiento; observando así dos tipos de crecimiento, los cuales se identificaron morfológicamente así como la identificación de la segunda cepa se realizó mediante técnicas moleculares (PCR), indicadas en el capítulo 2. De acuerdo a esto, de ambas cepas se hicieron preparaciones semipermanentes para observar sus características al microscopio compuesto. Estas preparaciones fueron realizadas colocando una gota de lactofenol en el portaobjetos y posteriormente se colocó un pedacito de PDA, sobreponerle un cubreobjetos, se pasó por el mechero para eliminar las burbujas y así poder observar al microscopio compuesto las características que Leslie y Summerell, (2006) reportan.

Formación de fialides

Se realizaron montajes en una cámara húmeda mediante un trocito de medio de cultivo PDA con micelio, colocado en un portaobjetos y su posterior cubreobjetos y colocados en una caja Petri con sanitas húmedas, esto con la finalidad de

observar las fialides de los hongos y así poder tener una identificación más certera (Figura 1).

Para observar las coloraciones de las cepas se prepararon tubos de ensaye con medio de cultivo pulpa de papa, los cuales son colocados de manera inclinada para inducir una superficie donde el hongo pueda crecer y provocar una coloración en la parte inferior del tubo de ensaye (Hernández, 1992)

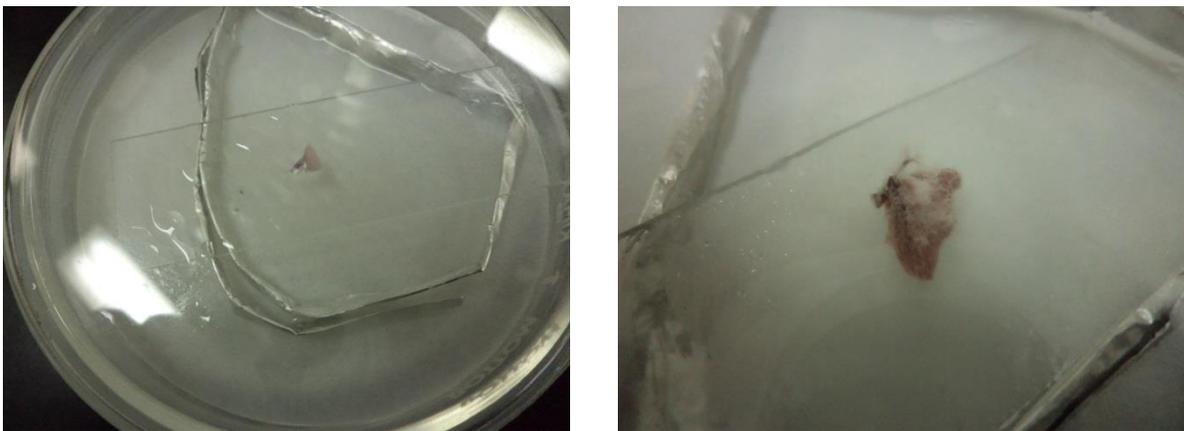


Figura 1.- Siembra en cámara húmeda para la formación de fialides.

Pruebas de patogenicidad

Cuando un patógeno se encuentra en una planta enferma, puede ser fácilmente identificado utilizando manuales especializados; en caso de que se tenga la certeza de que el patógeno es la causa de la enfermedad, podrá considerarse entonces que ha concluido el diagnóstico. Sin embargo, en caso de que sea probable que el patógeno represente la causa de la enfermedad, pero que no existan registros anteriores que apoyen a esa suposición, tendrán que considerarse los siguientes puntos para comprobar la hipótesis de que el patógeno es la causa de esa enfermedad (Agrios, 2006).

- 1.- El patógeno debe encontrarse asociado con la enfermedad en todas las plantas enfermas que se examinen.
- 2.- El patógeno debe aislarse y desarrollarse en un cultivo puro en medios nutritivos y se deben describir sus características (parásito no obligado), o bien debe permitirse que se desarrolle sobre una planta hospedante susceptible (parasito obligado) y registrar su presencia y los efectos que produzca.
- 3.- El patógeno que se desarrolle en un cultivo puro debe ser inoculado en plantas sanas de la misma variedad o especie en que apareció la enfermedad y debe producir la misma enfermedad en las plantas inoculadas.
- 4.- El patógeno debe aislarse una vez más en un cultivo puro y sus características deben corresponder a las anotadas en el segundo punto (Agrios, 2006).

Preparación del inóculo

Para tal efecto, en el presente estudio se usaron en la preparación del inóculo cultivos monospóricos, conservados en medio de cultivo bajo en nutrientes para evitar la pérdida de patogenicidad.

Los cultivos monospóricos fueron desarrollados a través de punta de hifa; se sembró el hongo en la caja petri dejándolo desarrollar hasta que tuvo un crecimiento de 5-6 días y se observó al microscopio compuesto una hifa que se encontró solitaria y se cortó; esta punta cortada se sembró en nuevas cajas petri con PDA (Cañedo *et al.*, 2004).

El inóculo de las dos cepas se incrementó en cajas Petri con medio de cultivo Agua Agar, esto porque en el suelo las dos cepas se encuentran de forma natural (Monreal, 1988; Vargas, 2006). Se preparó una solución con el crecimiento

micelial de 20 cajas Petri por litro de agua (10 cajas por cepa) para lograr una concentración de 10^6 conidios/ mL; se adicionó el medio de cultivo con el micelio de las cajas a 600 mL de agua Destilada y se licuó, posteriormente se agregaron 4mL de Tween 20 (Figura 2).



Figura 2.- Preparación de la Solución para el inóculo.

Inoculación de variedades para los Postulados de Koch

El procedimiento para la inoculación fue la selección de 28 variedades de semillas de Trigo utilizadas en Pénjamo, Guanajuato, las cuales fueron proporcionadas por el INIFAP-CEVAMEX; (Anexo 1) una cantidad de 80 semillas de cada variedad fueron colocadas en 28 cajas Petri desechables, y se les adicionó la solución de inoculación preparada por un lapso de 24 horas para la infección de las semillas por el patógeno (Figura 3).

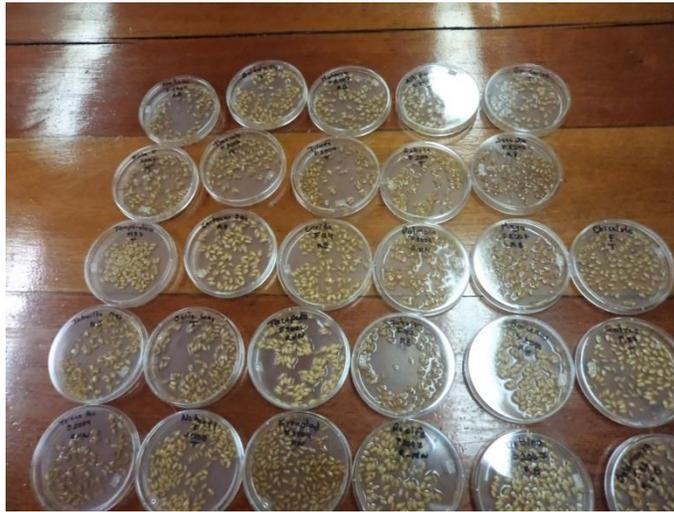


Figura 3.- Inoculación a la semilla de 28 variedades de trigo.

Una vez transcurrido este tiempo las semillas fueron colocadas en macetas de plástico con suelo esterilizado y humedecido previamente, transfiriendo 5 semillas por maceta y utilizando 4 repeticiones y un testigo sin inocular por cada una de las 28 variedades.

Las macetas fueron colocadas en el invernadero a una humedad relativa del 100% y a una temperatura media de 22° con ayuda de un humidificador por un lapso de 8 días para observar micelio en plántulas y pudrición de semillas. Con este procedimiento se produjeron síntomas iniciales, por consiguiente se obtuvieron nuevas muestras para aislar posteriormente el patógeno (Figura 4).



Figura 4.- a) Siembra de las semillas previamente inoculadas, b) Variedades con 4 repeticiones y su testigo.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los Postulados de Koch fue realizado mediante el software Statistical Analysis System (SAS Institute 1999), empleando el modelo lineal general por medio del procedimiento PROC GLM, para el análisis de varianza (ANOVA), para las variables porcentaje de germinación, porcentaje de necrosis en raíz, longitud de follaje y longitud de raíz.

Los análisis estadísticos fueron realizados para diferentes situaciones: ANOVA's individuales por variedad, ANOVA's individuales por inoculación, y ANOVA's combinados a través de variedades.

Este estudio se complementó con comparaciones múltiples de medias por el método de Tukey con un nivel de significancia del 5%.

RESULTADOS

Aislamiento y Purificación

El crecimiento micelial se registró a los 15 días posteriores a la siembra en medio de cultivo PDA (Leslie y Summerell, 2006), donde se pudieron observar dos tipos de cepas, una con incidencia del 40% y la otra con un 65% del total de las cajas petri sembradas. La primera cepa registró coloraciones blanco amarillentas y la segunda registró colores purpura violetas en medios de cultivo PDA y pulpa de papa, (Leslie y Summerell, 2006), en todos los aislamientos se obtuvieron colonias de este tipo, por lo que se puede acertar que una o las dos cepas son las causantes de los síntomas de espiga blanca y pudrición de raíz de trigo (Figura 5)

Identificación del agente causal por características morfológicas

F. graminearum Schwabe presentó coloraciones en medio de cultivo PDA en tonos de blancos a amarillentos, con abundante micelio, los macroconidios tuvieron medidas de entre 22-48 × 2.5-4.2µm, alargados y uniformes con paredes gruesas, la célula apical es moderadamente curvada y puntiaguda y en la célula basal bien desarrollada la forma del pie, con 5 – 6 septas las cuales son bien diferenciadas. Hay ausencia de microconidios y presencia de clamidosporas de rápida formación. (Leslie y Summerell. 2006) (Figura 6).



Figura 5: Coloraciones y tipo de colonia fungal; a) *F. graminearum* en PDA; b) *F. graminearum* en pulpa de papa; c) *F. proliferatum* en PDA; d) *F. proliferatum* en pulpa de papa.

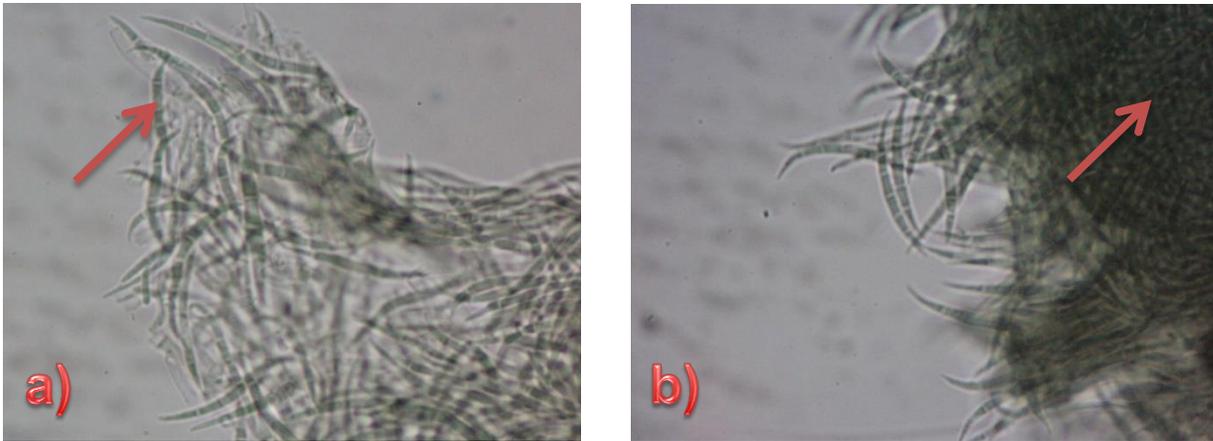


Figura 6.- a) Macroconidios de *F. graminearum*, b) Esporodoquio

F. proliferatum (Matsushima) Nirenberg. Las características en medio de cultivo PDA demostraron abundante micelio, en un inicio fue de color blanco y con el paso de los días llegó a ser color púrpura. Los esporodocios son producidos con frecuencia o en su defecto pueden ser difíciles de encontrar son de color pálido a un naranja tenue, los macroconidios son alargados de paredes delgadas, la célula apical es curvada y la célula basal está mal desarrollada generando de 3 - 5 septas, los macroconidios varían de un medio de cultivo a otro, es por eso que para la localización de estas estructuras es necesaria la búsqueda en medios de cultivos frescos y que no hayan sido propagados para su conservación. En los macroconidios se observaron medidas de $24 - 33 \mu\text{m} \times 2 - 2.3 \mu\text{m}$. (Leslie y Summerell, 2006).

En el caso de los microconidios tienen forma de tabique con la base aplanada y no tienen septas (Leslie y Summerell, 2006). Estos microconidios se encuentran en cadena pero generalmente más cortos que los producidos por *F. verticillioides*, pero al contrario de estos, aquí se encuentran en polifialides, ya que esta característica es base para la distinción entre estas dos especies, los macroconidios tienen medidas que van de $4.6 - 12 \mu\text{m} \times 1.60 - 2.5 \mu\text{m}$ (Figura 7).

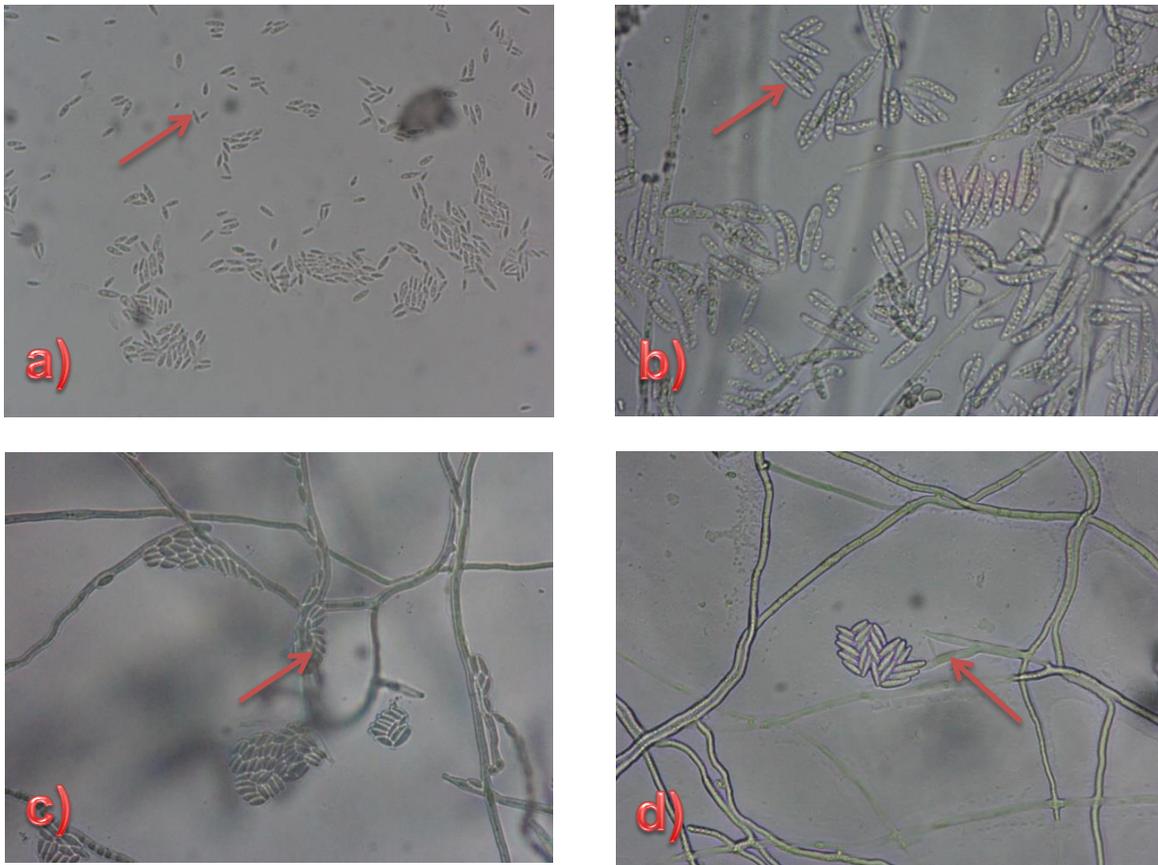


Figura 7.- a) Microconidios de *F. proliferatum*, b) Macroconidios, c) Microconidios en Cadena, d) Polifialides.

Postulados de Koch

Los síntomas que se tomaron en cuenta para la obtención del material enfermo fueron: plantas con espigas blancas y necrosis en raíz (Vargas, 2006; Moreno, 1996). Debido a que *F. proliferatum* y *F. graminearum* se encuentran con otro complejo de patógenos en el suelo (Vargas, 2006), se inocularon las dos cepas en las semillas de trigo a una concentración de 10^6 conidios por mL.

Se procedió a retirar la plántula del suelo con cuidado de no lastimar la raíz y se lavó con agua corriente para eliminar el exceso de tierra; esto se realizó con el fin de evaluar porcentaje de germinación, porcentaje de necrosis (0% al 100%), longitud de follaje y longitud de raíz de cada una de las repeticiones de las 28 variedades.

Los síntomas iniciales a los 5 días de evaluación en condiciones de 100 % de humedad relativa fue la ausencia de germinación de plántulas de ciertas repeticiones de las 28 variedades de trigo, al desenterrar la semilla que no había germinado se pudo observar pudrición de la semillas y la presencia de micelio blanco en la testa de la semilla. (Figura 8).

Otros síntomas fueron observados a los 10 días de la germinación, y se produjeron plántulas de trigo de porte pequeño y raíz de menor tamaño respecto al testigo. (Figura 9) (Castañeda, 2006).

Los datos tomados de necrosis, germinación, longitud de follaje y raíz se analizaron con el paquete estadístico SAS para el análisis de la varianza y las pruebas de comparaciones múltiples de medias por el método de Tukey con un nivel de significancia de 5%.



Figura 8.- a) Semillas no germinadas con pudrición, b) Semillas con la presencia de micelio en la testa.



Figura 9.- a) Plántula deforme; b) Plántula con micelio en la semilla; c) y d) Comparación testigo y repeticiones (Tlaxcala F2000 y Bátán F96).

De las semillas y plántulas con síntomas más notorios se hizo el re-aislamiento para cumplir con el cuarto postulado de Koch. Se realizó el mismo procedimiento citado por Schaad *et al.*, (2002) y se obtuvieron colonias fungales en medio de cultivo PDA similares a las obtenidas de las muestras de la localidad Tepetate de Negrete. Las incidencias fueron registradas al décimo día para observar el porcentaje de colonias por especie, se registraron un total de 40% para *F. graminearum* y 85% para *F. proliferatum* (Figura 10).

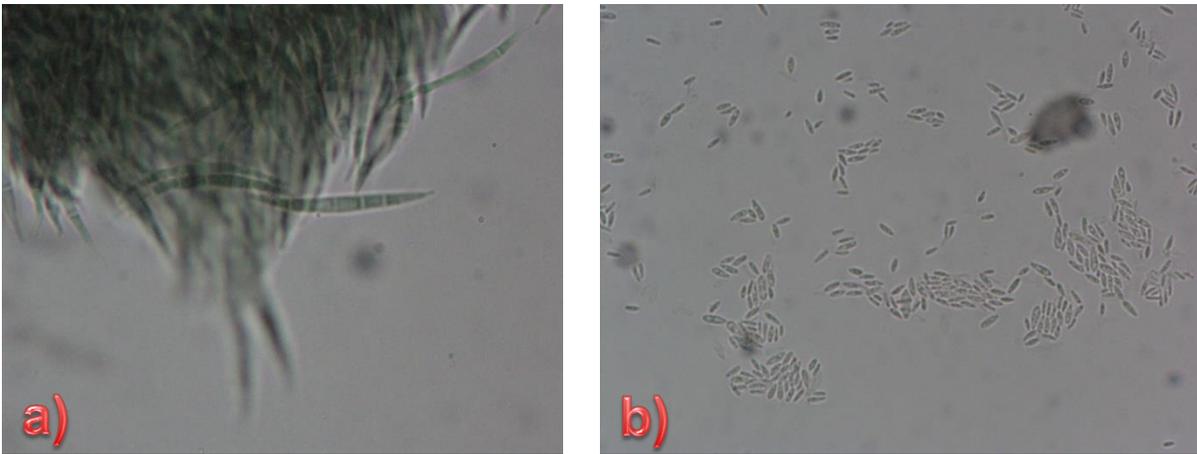


Figura 10: Preparaciones de los reislamientos de la pudrición de raíz de trigo; a) *F. graminearum*; b) *F. proliferatum*.

Análisis estadístico

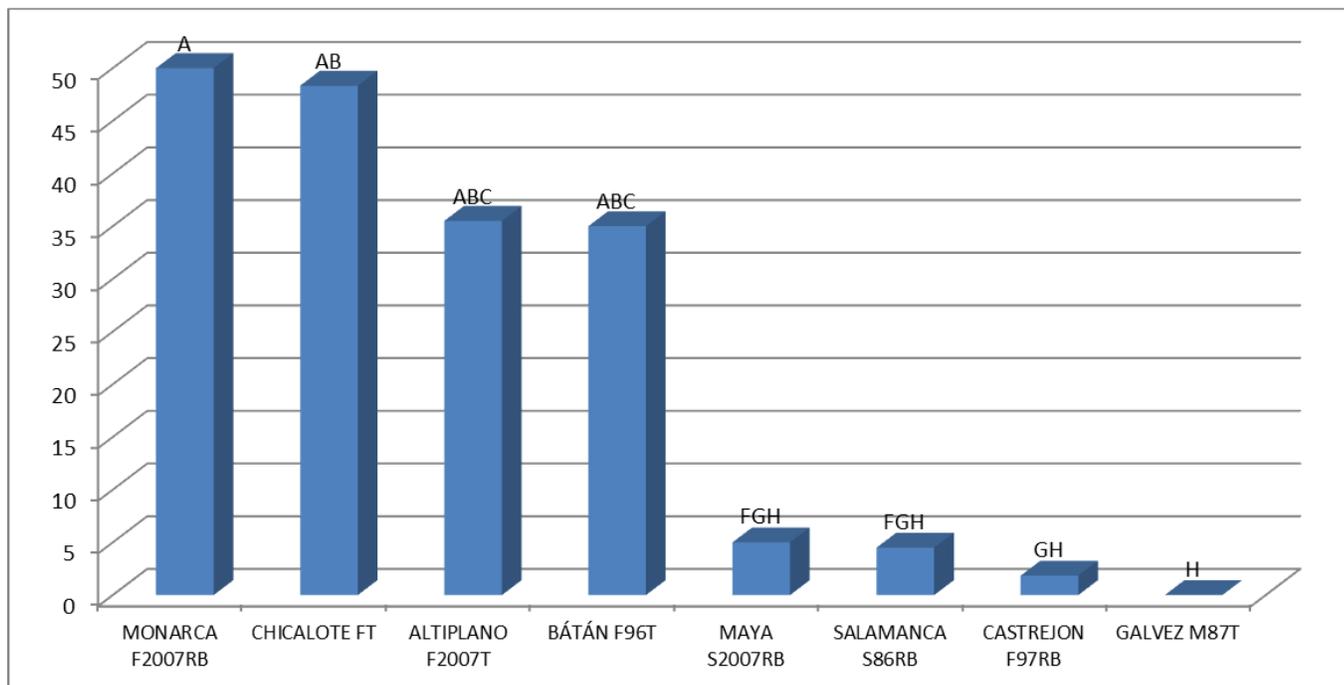
Los resultados de los postulados de Koch fueron estudiados mediante el software Statistical Analysis System (SAS Institute 1999), empleando el modelo lineal general por medio del Procedimiento PROC GLM.

Este estudio se complementó con pruebas de comparaciones múltiples de medias por el método de Tukey con un nivel de significancia del 5%.

El análisis fue realizado utilizando el modelo lineal correspondiente a diseño bloques completos al azar, donde se utilizaron 28 variedades (tratamientos), se evaluaron 4 variables que son: germinación, porcentaje de necrosis en raíz, longitud de raíz y longitud de follaje, con 4 repeticiones y un testigo absoluto.

La obtención de los datos para los análisis estadístico, para evaluar germinación fueron tomados a los 5 días después de sembrar las semillas de las 28 variedades en el invernadero, y las variables de necrosis de raíz, longitud de raíz y longitud de follaje fueron tomados a los 12 días después de la germinación de las plántulas, en los dos casos, la toma de datos se dio bajo el invernadero a unas condiciones de 100% de humedad relativa y 22 °C con ayuda del humificador.

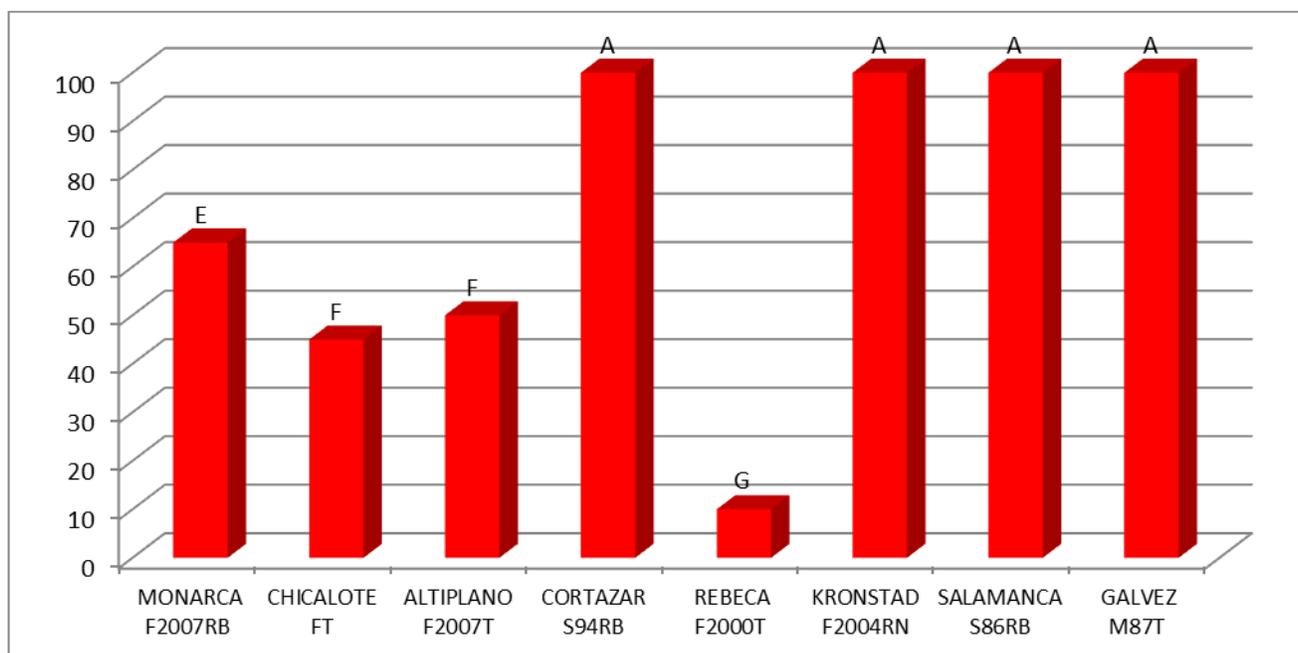
Los resultados fueron los siguientes:



Gráfica 1: Comparación múltiple de medias por el método de Tukey, con nivel de significancia al 5% para la variable porcentaje de necrosis en raíz con inoculación de *Fusarium spp.*

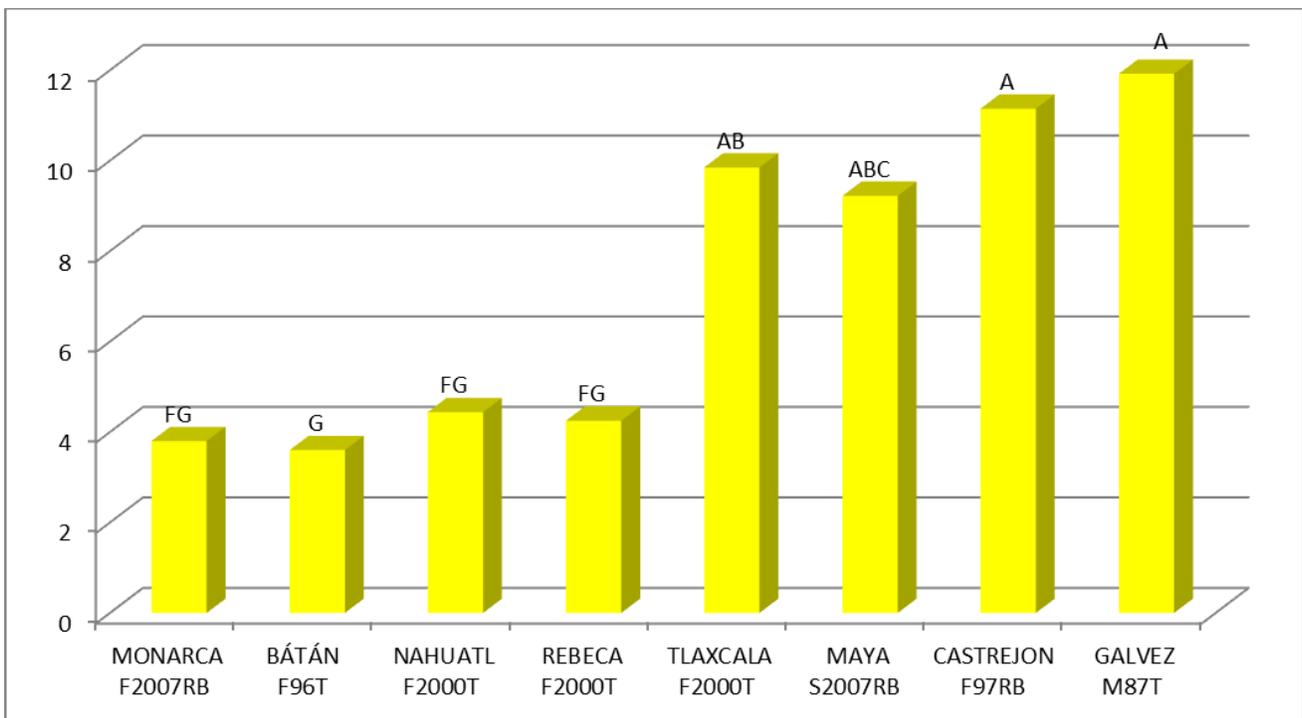
En cuanto a la variable estudiada de necrosis de raíz, el análisis de las 28 variedades, demostró que las mejores variedades son Gálvez M87, Castrejón F97, Salamanca S86 y Maya S2007, obtuvieron las menores medias en cuanto a necrosis de raíz en las plantas de trigo, esto significa que estas variedades son las que presentan un nivel más alto de tolerancia hacia la inoculación de *Fusarium*, y en caso contrario las variedades Monarca F2007, Chicalote FT, Altiplano F2007 y BÁTÁN F96 que presentaron un nivel más alto de necrosis en la raíz, son las más susceptibles hacia la inoculación del patógeno.

Esto lo podemos corroborar mediante la agrupación Tukey con un nivel de significancia del 5%, para esta variable de necrosis de raíz con inoculación.



Gráfica 2: Comparación múltiple de medias por el método de Tukey, con nivel de significancia al 5% para la variable porcentaje de germinación con inoculación de *Fusarium spp.*

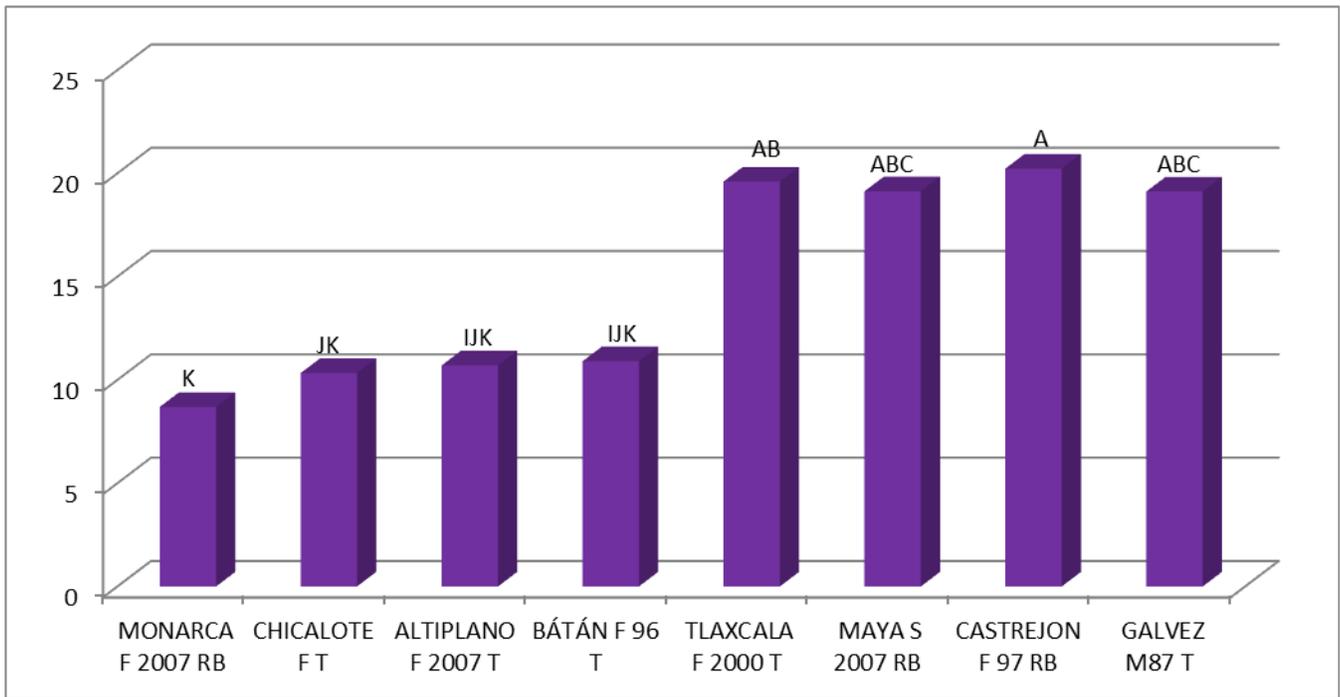
En el caso de la variable germinación, muchas de las variedades obtuvieron 100% de germinación; tales como Gálvez M 87, Salamanca S86, Kronstad F2004, Cortázar S94, Don Carlos RT, Palmerin F2004, Tacupeto F2001, Santa Lucia, Torocahui S2004, Eneida F94 y Tlaxcala F2000, aunque en la gráfica solo se mencionan 4, es para puntualizar que estos datos se dieron por que el experimento se desarrolló en condiciones de invernadero, con niveles de 100% de humedad relativa y temperaturas de 22 °C, que son condiciones idóneas para la germinación, las cuales fueron constantes durante todo el experimento, asegurando así la expresión de los síntomas y signos de interés, que son necrosis de raíz y micelio del hongo *Fusarium*. Para el caso de las variedades que no tuvieron un alto porcentaje de germinación como lo fueron Monarca F2007, Chicalote FT, Altiplano F2007 y Rebeca F2000, si tuvieron un efecto directo de la inoculación, por lo que son más susceptibles al hongo en condiciones de invernadero y por consecuente en condiciones de campo.



Gráfica 3: Comparación múltiple de medias por el método de Tukey, con nivel de significancia al 5% para la variable longitud de raíz con inoculación de *Fusarium spp.*

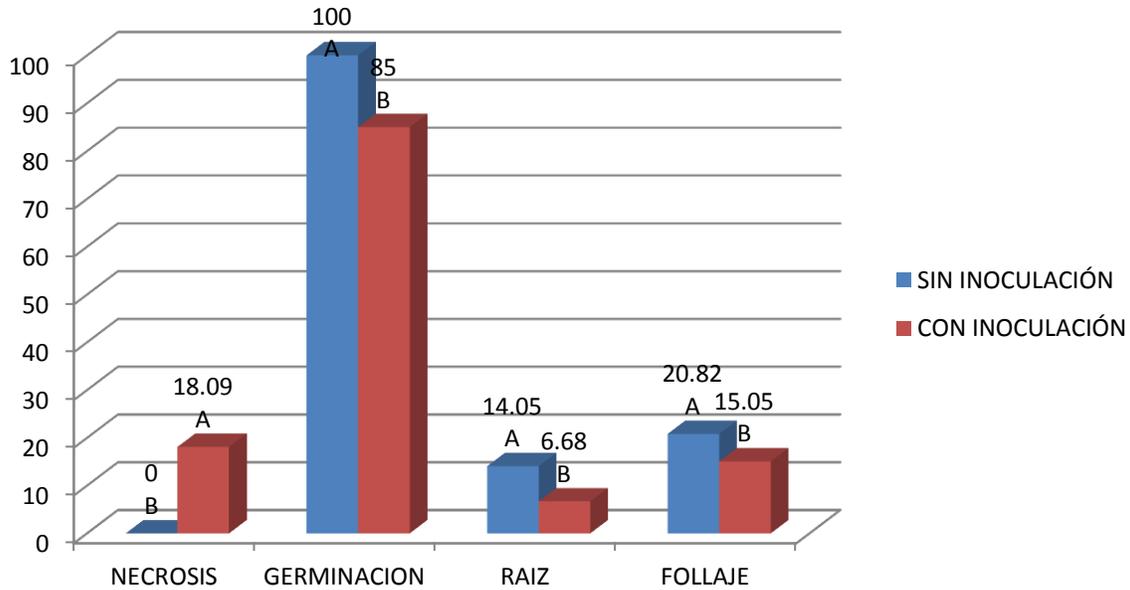
Con respecto a la variable longitud de raíz, las variedades que obtuvieron un valor menor a consecuencia de la inoculación del patógeno *Fusarium*, y por consiguiente una necrosis en su raíz y así tener una raíz más frágil y pequeña, fueron Monarca F2007, Bátán F96, Náhuatl F2000 y Rebeca F2000, considerándose las más susceptibles al ataque de *Fusarium*.

Las Variedades Gálvez M87, Castrejón F97, Tlaxcala F2000 y Maya S2007 mostraron mayor tolerancia a la inoculación del patógeno, teniendo así una longitud de raíz mayor a las demás, y esto se puede comprobar en la gráfica 1, donde las variedades Gálvez M87, Castrejón F97 y Maya S2007 obtuvieron menores porcentajes de necrosis en raíz.



Gráfica 4: Comparación múltiple de medias por el método de Tukey, con nivel de significancia al 5% para la variable longitud de follaje con inoculación de *Fusarium spp.*

La última variable analizada fue longitud de follaje, la cual generó resultados muy similares, donde se puede observar que las variedades que obtuvieron una menor longitud de follaje fueron Monarca F2007, Chicalote FT, Altiplano F2007 y BÁTÁN F96, siendo estas variedades susceptibles al ataque del hongo *Fusarium*, y a consecuencia del ataque en la raíz desarrollaron una longitud del follaje menor que las demás, y con respecto a las Variedades Gálvez M87, Castrejón F97, Tlaxcala F2000 y Maya S2007 mostraron la longitud de follaje más grande, para verificar esto, las gráficas 1 y 3 indican una coincidencia en las mejores variedades para estas 4, por lo que podemos deducir que estas variedades pueden tener el nivel más alto de tolerancia al ataque en la raíz y expresión de necrosis por parte del complejo *Fusarium* en condiciones de invernadero y en campo donde se presenten las condiciones climáticas aptas para el desarrollo del hongo.



Gráfica 5: Comparación múltiple de medias por el método de Tukey, con nivel de significancia al 5% con inoculación y sin inoculación (testigo), para las variables porcentaje de necrosis en raíz, porcentaje de germinación, longitud de raíz y longitud de follaje.

La grafica muestra unos resultados comparados con el análisis de las variedades que fueron inoculadas respecto a su testigo, las agrupaciones Tukey entre cada variable indican que existe diferencia significativa con inoculación y sin inoculación, esto es, que para la variable necrosis el testigo obtuvo una media de cero y con inoculación fue un porcentaje del 18.09%; en germinación, la media sin inoculación para esta variable fue del 100% y con inoculación fue un 85%; en longitud de raíz la media sin inoculación obtuvo un resultado de 14.05% mayor respecto a la media de 6.68% que corresponde a las variedades inoculadas. Por último la variable longitud de follaje sin inoculación obtuvo una media de 20.82% en comparación con un 15.05% de las plantas que obtuvieron una inoculación de *Fusarium*.

DISCUSIÓN.

Los patógenos aislados e identificados en laboratorio concuerdan con los reportados en algunos trabajos de trigo realizados por Hernández (1992) y Contreras (1999). Las especies de hongos fitopatógenos encontrados en la raíz necrosada de trigo de la variedad Cortázar S94 procedente de Tepetate de Negrete, Pénjamo Gto. fueron: *F. graminearum* y *F. proliferatum* con incidencias bajo condiciones de laboratorio de 40% y 65% respectivamente, las cuales corresponden con algunas de las mencionadas por Zillinsky (1984), Prescott (1986) y Wiese (1987), además de que constituyen el grupo de hongos que atacan al cultivo de trigo y demás cereales de grano pequeño, en la corona del tallo y como causales de la pudrición de raíz y espiga blanca además que pueden transmitirse de un ciclo a otro por medio de la semilla y residuos vegetales.

Los patógenos que fueron aislados en laboratorio concuerdan con la morfología descrita por Leslie y Summerell (2006) en cuanto a todas las características morfológicas de tamaño de macroconidios, fialides, coloraciones de las cepas en medio de cultivos específicos, y tipo de micelio, así como la formación de sus estructuras reproductivas en similitud con lo mencionado por los autores para *F. graminearum* y *F. proliferatum* (Leslie y Summerell 2006).

Los re-aislamientos resultantes de los postulados de Koch corresponden a las mismas cepas y las mismas especies identificadas morfológicamente que fueron aisladas en el primer postulado (Agris, 2006), por lo que la necrosis, pudrición de raíz y micelio observado en condiciones de invernadero inoculadas en 28 variedades fueron las correspondientes al complejo de *F. graminearum* y *F. proliferatum*, (Hernández, 1992; Contreras, 1999; Leslie y Summerell, 2006).

Estas dos cepas fueron inoculadas en las variedades de trigo debido a que estas dos especies se encuentran como habitantes del suelo del cultivo de trigo, junto con otro complejo de patógenos del genero *Fusarium* que pueden causar los síntomas de necrosis y espiga blanca del trigo (Vargas, 2006).

Todas las variedades son susceptibles al ataque de estos patógenos, esto se puede observar en la comparación múltiple de medias por el método de Tukey, en el caso del porcentaje de germinación hubo variedades que tuvieron 100% de germinación aunque fueron inoculadas, pero esto fue a causa de que el experimento se desarrolló en condiciones de invernadero con humedades relativas del 100%, lo que ayuda a la planta tener condiciones de humedad idóneas para germinar, y esto se realizó con la finalidad de poder observar síntomas y signos de la enfermedad (Hampton, 1980).

Para tener un mayor entendimiento de las variedades más susceptibles y las más tolerantes, se realizó un conjunto de las 4 variables estudiadas, con el fin de puntualizar las variedades que presentan más susceptibilidad o más tolerancia de dos o más variables, y con lo cual se puede obtener una conclusión más certera de las variedades que se pueden utilizar para el manejo de *Fusarium spp* (Villaseñor, 2000).

Hubo diferencias significativas con la comparación múltiple de medias entre las variedades analizando las cuatro variables estudiadas, es así que para el caso de las variables analizadas, las variedades más susceptibles fueron Monarca F2007, Chicalote FT, Bátán F96, Rebeca F2000 y Altiplano F2007. De estas 5 variedades, Monarca F2007 y Bátán F96, fueron las que presentaron más susceptibilidad tanto a necrosis como a germinación (Villaseñor, 2000).

De las 28 variedades inoculadas las que presentaron un grado de tolerancia más alto en base a la comparación múltiple de medias por el método de Tukey fueron Salamanca S86, Castrejón F97, Gálvez M87, Tlaxcala F2000 y Maya S2007, de estas 5 variedades, Castrejón F97 y Gálvez M87 fueron las que mostraron un nivel más alto de tolerancia hacia el conjunto de las 4 variables estudiadas (Villaseñor 1989, Villaseñor 1998, Villaseñor 2000).

Respecto al testigo hubo diferencias entre los tratamientos con inoculación y sin inoculación de *Fusarium*, por lo que se asume que las medias resultantes para las

4 variables analizadas son diferentes del testigo y que si hubo un efecto debido a la inoculación del patógeno (Grafica 5) (Villaseñor, 2000).

CONCLUSIÓN.

Las especies *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. equisetii*, *F. verticillioides* y *F. proliferatum*, son las que mayor incidencia tienen en el área de Pénjamo Guanajuato, por lo que se pudo identificar que *F. graminearum* y *F. proliferatum* se encuentran causando la pudrición de raíz y espiga blanca de trigo.

Estos patógenos se encuentran habitando el suelo agrícola de cultivos cerealícolas como trigo, por lo que no necesariamente estas dos especies puedan causar los síntomas de espiga blanca y necrosis, más sin embargo dependiendo de la zona en la que se encuentre el cultivo podemos encontrar alguna especie de manera predominante. Tal fue el caso de estudio donde la especie predominante en incidencia y Postulados de Koch fue *Fusarium proliferatum*, por lo que se concluye que es la especie que causa los síntomas de mayor importancia.

Se pudo comparar el efecto de la inoculación de las 28 variedades donde se asumía que estas variedades tendrían algún tipo de susceptibilidad o tolerancia específica diferente hacia la inoculación de patógenos del genero *Fusarium*. Se pudo observar que las variedades que más toleran al patógeno son Castrejón F97 y Gálvez M87, y caso contrario Monarca F2007 y Bátán F96 fueron las más susceptibles al analizarlas en sus cuatro variables. Estos análisis pueden variar bajo condiciones reales en campo, ya que fueron realizados bajo condiciones controladas de invernadero con humedades relativas del 100%, lo que puede influir para un buen desarrollo de las plántulas ya que no se encuentran bajo estrés hídrico, pero es la forma de aumentar la aparición de síntomas y signos del patógeno.

BIBLIOGRAFIA:

Agrios, G.N. 1986. Fitopatología. Editorial Limusa. México: 447 p.

Bishop, D. L. 2002. Gene expression of a vacuolar peroxidase with stress-induced pathogenesis in wheat sheaths. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 61: 65-71.

Castañeda, A. 2006. Especies de *Helminthosporium* asociadas a la semilla de cebada (*Hordeum vulgare*) en los Valles Altos de México. CHAPINGO. México. 42 pp.

Cañedo, Verónica., Ames, Teresa. 2004. Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos Lima, Perú; Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú, 62 p.

Clements, M. J., C. E. Kleinschmidt, C. M. Maragos, J. K. Pataky, and D. G. White. 2003. Evaluation of inoculation techniques for *Fusarium* ear rot and fumonisin contamination of corn. *Plant Disease* 87: 147-153.

Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato, A. C. (CESAVEG). 2013. Principales especies de *Fusarium* spp., en el cultivo del trigo. Informe Técnico.

Contreras, M. O. 1999. Efecto de las enfermedades foliares y transmisión por semilla en cereales de grano pequeño en ambientes húmedos de temporal. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Méx. 49p.

Cotten, T. K., and G. P. Munkvold. 1998. Survival of *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum*, and *F. subglutinans* in maize stalk residue. *Phytopathology* 88: 550-555.

Fisher, N. L., W. F. O. Marasas, and T. A. Toussoun. 1983. Taxonomic importance of microconidial chains in *Fusarium* section *Liseola* and effects of water potential on their formation. *Mycologia* 75: 693-698.

Gilbert, J., R. L. Conner, M. R. Fernandez, D. McLaren, and S. M. Woods. 2003. Role of spring wheat seed infested with *Fusarium graminearum* in spread and development of Fusarium head blight and effects on agronomic performance. *Canadian Journal of Plant Pathology* 25: 73-81.

Gilbert, J., and W. G. D. Fernando. 2004. Epidemiology and biological control of *Gibberella zeae*/*Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 26: 464-472.

Gilchrist, L., Fuentes, G., Martínez, C., López, M., Duveiller, E., Singh, R., Henry, M., García, I. 2005. Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada. Segunda edición. México, D.F.: CIMMYT. 68 pp.

Hampton, J. G. 1980: Fungal pathogens in New Zealand certified wheat seed. *N.Z. Journal of Experimental Agriculture* 8: 301-304.

Hernández R. R. 1992. Identificación y cuantificación de patógenos asociados a la semilla de trigo (*Triticum aestivum* L.) asperjado con fungicidas en campo de Juchitepec, México. Tesis de licenciatura, Ingeniero Agrónomo Especialista en Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo México. 43 Pp.

Jackowiak, H., D. Packa, M. Wiwart, and J. Perkowski. 2005. Scanning electron microscopy of *Fusarium*-damaged kernels of spring wheat. *International Journal of Food Microbiology* 98: 113-123.

Joffe, A. Z., and J. Palti. 1977. Species of *Fusarium* found in uncultivated desert-type soils in Israel. *Phytoparasitica* 5: 119-122.

Kedera, C. J., J. F. Leslie, and L. E. Clafin. 1994. Genetic diversity of *Fusarium* section *Liseola* (*Gibberella fujikuroi*) in individual maize plants. *Phytopathology* 84: 603-607.

Koch, N., and W. Huth. 1997. Interaction of barley yellow dwarf virus and *Fusarium culmorum* (W. G. Sm.) Sacc. in winter wheat. *Journal of Phytopathology* 145: 425-428.

Kommedahl, T., H. K. Abbas, P. M. Burnes, and C. J. Mirocha. 1988. Prevalence and toxigenicity of *Fusarium* spp. from soils of Norway near the Arctic Circle. *Mycologia* 80: 790-794.

Langevin, F., F. Eudes, and A. Comeau. 2004. Effect of trichothecenes produced by *Fusarium graminearum* during Fusarium head blight development in six cereal species. *European Journal of Plant Pathology* 110: 735-746.

Leslie-F. Jonh., Summerell-A. Brett. 2006. The Fusarium Laboratory Manual. Blackwell Publishing 369 pp.

Leslie, J. F., K. A. Zeller, M. Wohler, and B. A. Summerell. 2004. Interfertility of two mating populations in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *European Journal of Plant Pathology* 110: 610-618.

Mandeel, Q. A. 1996. A survey of *Fusarium* species in an arid environment of Bahrain. IV. Prevalence of *Fusarium* species in various soil groups using several isolation techniques. *Cryptogamie Mycologie* 17: 149-163.

Marin, S., V. Sanchis, A. Teixido, R. Saenz, A. J. Ramos, I. Vinas, and N. Magan. 1996. Water and temperature relations and microconidial germination of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* from maize. *Canadian Journal of Microbiology* 42: 1045-1050.

Mathre, D., ed. 1997. *Compendium of Barley Diseases*, 2nd ed. APS Press, St. Paul, Minnesota.

Morales-Rodríguez, I; Yáñez-Morales, M; Silva Rojas, HV; García de los Santos, G; Guzman de Peña, D. 2006. Biodiversity of *Fusarium* species in Mexico associated with ear rot in maize, and their identification using a phylogenetic approach. *Mycopathologia* 163:31-39.

Moreno, M. H. 1996. Análisis físico y biológico de semillas agrícolas. Tercera edición. Universidad Nacional Autónoma de México. México, DF. 393p.

Moretti, A., G. Mulè, A. Susca, M. T. González-Jaén, and A. Logrieco. 2004. Toxin profile, fertility and AFLP analysis of *Fusarium verticillioides* from banana fruits. *European Journal of Plant Pathology* 110: 601-609.

Mulè, G., A. Susca, G. Stea, and A. Moretti. 2004. A species-specific PCR assay based on the calmodulin partial gene for identification of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. subglutinans*. *European Journal of Plant Pathology* 110: 495-502.

Munkvold, G. P., R. L. Helmich, and W. B. Showers. 1997. Reduced Fusarium ear rot and symptomless infection in kernels of maize genetically engineered for European corn borer resistance. *Phytopathology* 87: 1071-1077.

Nelson, P. E., T. A. Toussoun, and W. F. O. Marasas. 1983. *Fusarium Species: An Illustrated Manual for Identification*. Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania.

Nelson, P. E., L. W. Burgess, and B. A. Summerell. 1990. Some morphological and physiological characters of *Fusarium* species in sections *Liseola* and *Elegans* and similar new species. *Mycologia* 82: 99-106.

Nirenberg, H. I. 1976. Untersuchungen über die morphologische und biologische Differenzierung in der *Fusarium* Sektion *Liseola*. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt Für Land- und Forstwirtschaft (Berlin – Dahlem)* 169: 1-117.

Presscot, J.M. Burnett, P. A. Saari, Ransom, J. Browman, J. W. De Williano, Singn, R. P., Bekele, G. 1986. Enfermedades y plagas del trigo: Una guía para su identificación en campo. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. México, DF. 135p.

Saremi, H., L. W. Burgess, and D. Backhouse. 1999. Temperature effects on the relative abundance of *Fusarium* species in a model plant-soil ecosystem. *Soil Biology and Biochemistry* 31: 941-947.

SARH. 1992. Guía Fitosanitaria para el cultivo de Trigo. Serie Sanidad Vegetal. Sistema Producto Trigo. 1-18 pp. y 3-48 pp.

Schaad, N.W., Jones, J.B., and Chun, W. 2002. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. American Phytopathological Society. Third Edition. APS Press. 373 pp.

Tiedt, L. R., and W. J. Jooste. 1988. Ultrastructure of collarette formation in *Fusarium* section *Liseola* and some taxonomic implications. *Transactions of the British Mycological Society* 90: 531-536.

Tschanz, A. T., R. K. Horst, and P. E. Nelson. 1976. The effect of environment on sexual reproduction of *Gibberella zeae*. *Mycologia* 68: 327-340.

Vargas Ledesma, Norma Gabriela. 2006. Hongos asociados a la semilla de trigo (*Triticum aestivum* L.) de riego, en el Valle de Santiago, Guanajuato. Tesis de Licenciatura. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 77 pp.

Villaseñor M., H. E., S. Solano y R. Moreno. 1989. Temporalera M87: nueva variedad de trigo para temporal. Chapingo, Estado de Méx., México. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Valle de México. 24 p. (Folleto Técnico No 13).

Villaseñor M., H. E., y R. Moreno. 1998a. Batán F96: nueva variedad de trigo para siembras de temporal. Chapingo, Estado de Méx., México. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Valle de México. 19 p. (Folleto Técnico No. 8).

Villaseñor M., H. E., E. Espitia, S. Solano y A. Salazar. 1998b. Romoga F96: nueva variedad de trigo para siembras de temporal. Chapingo, Estado de Méx., México. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, Instituto Nacional de

Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Valle de México. 20 p. (Folleto Técnico No. 9).

Villaseñor M., H. E., E. Espitia, J. Huerta, E. Solís, D. Aguirre, A. María y A. Salazar. 2000a. Náhuatl F2000: nueva variedad de trigo para siembras en temporales críticos y medio lluviosos en México. Chapingo, Estado de Méx., México. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Valle de México. (Folleto Técnico, en prensa).

Villaseñor M., H. E., E. Espitia, J. Huerta, A. María, L. Osorio y A. Aguirre. 2000b. Tlaxcala F2000: nueva variedad de trigo para siembras de temporal en México. Chapingo, Estado de Méx., México. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Valle de México. (Folleto Técnico, en prensa). 21.

Villaseñor M., H. E., E. Espitia, J. Huerta, R. González, L. Osorio, A. Aguirre y A. María. 2000c. Juchi F2000: nueva variedad de trigo para siembras de temporal en México. Chapingo, Estado de Méx., México. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Valle de México. (Folleto Técnico, en prensa).

Villaseñor M., H. E., E. Espitia, R. González, J. Huerta y A. María. 2000d. Rebeca F2000: nueva variedad de trigo para siembras en temporales lluviosos y medio lluviosos en México. Chapingo, Estado de Méx., México. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Valle de México. (Folleto Técnico, en prensa).

Waalwijk, C., P. Kastelein, I. de-Vries, Z. Kerényi, T. van der Lee, T. Hesselink, J. Kohl, and G. Kema. 2003. Major changes in *Fusarium* spp. in wheat in the Netherlands. *European Journal of Plant Pathology* 109: 743-754.

Waalwijk, C., R. van der Heide, I. de Vries, T. van der Lee, C. Schoen, G. Costrel de Corainville, I. Hahn, P. Kastelein, J. Kohl, P. Lonnet, T. Demarquet, and G. H. J. Kema. 2004. Quantitative detection of *Fusarium* species in wheat using TaqMan. *European Journal of Plant Pathology* 110: 481-494.

White, D. G., ed. 1999. *Compendium of Corn Diseases*, 3rd ed. APS Press, St. Paul, Minnesota.

Wiese, M. V. 1987. *Compendium of wheat diseases*. The American Phytopathological Society. 2^a edición. 112p.

Zillinsky, F.J. 1984. *Guía para la Identificación de Enfermedades en Cereales de Grano Pequeño*. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. CIMMYT. México, D.F. 141p.

CAPITULO II. IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *Fusarium* spp. POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA Y PCR EN TRIGO (*Triticum aestivum* L.) EN EL BAJÍO, MÉXICO

Hans Errol **Vega-Portillo**¹, Gerardo **Leyva-Mir**¹, Mateo **Vargas-Hernandez**¹, Omar G. **Alvarado-Gómez**² Héctor Eduardo **Villaseñor-Mir**³

¹Protección Vegetal, Universidad Autónoma de Chapingo. Carretera México- Texcoco. Km. 38.5, Texcoco, Estado de México. ² Universidad Autónoma de Nuevo León ³ INIFAP-CEVAMEX.

RESUMEN

En el año 2012 se colectaron plantas de trigo de la variedad Cortázar S94, en la localidad de Tepetate de Negrete municipio de Pénjamo, Guanajuato, con la finalidad de identificar el o los agentes causales de la espiga blanca y la pudrición de raíz de trigo. Se realizaron montajes para observar las estructuras reproductivas de las especies de *Fusarium* al microscopio electrónico de barrido y tomar mediciones de conidios y conidióforos en sus fialides. También se amplificaron por PCR y se secuenciaron la región intergénica (ITS) y los genes del factor de elongación y la calmodulina. Las secuencias de ADN del gen calmodulina de las muestras amplificadas por PCR de cultivos monospóricos dieron un 99% de similitud con *F. proliferatum* y con esto se comprobó que esta especie es la que se encuentra con mayor incidencia en la zona de Pénjamo, Guanajuato, causando los síntomas de espiga blanca y pudrición de raíz en trigo.

SUMMARY

In 2012 wheat plants of Cortazar S94 variety were collected in Tepetate de Negrete, Penjamo Guanajuato, with the finality to identify the cause(s) agents of the white tassel and the wheat root rotting. It was realized assemblies to observe on electronic microscope the reproductive structures of *Fusarium* species with larger incidence, and then to take measures of conidians on its phialides. It was too amplified by PCR the ITS region and the genes of the elongation factor and calmodulin, both were sequenced. The sequences of the calmodulin gene amplified by PCR from mono-spores casted out a 99% of similarity to *F.*

proliferatum and with this result it could prove, this specie is most finding in the zone of Penjamo, Guanajuato and it is cause of the symptoms of white tassel and root rotting wheat.

INTRODUCCIÓN

El género *Fusarium* tiene una distribución mundial y muchas de sus especies son fitopatógenos que infectan a una amplia gama de plantas de cultivo, incluyendo los cereales tales como el maíz, trigo, avena y cebada. La contaminación por *Fusarium* es un problema agrícola importante, ya que puede reducir la calidad y el rendimiento, pero más importante aún, muchas especies del género producen micotoxinas responsables de enfermedades graves en los seres humanos y animales (Nicolaisen *et al.*, 2008).

La fusariosis de la espiga en los cereales de grano pequeño, de la mazorca de maíz y de la pudrición del tallo es causada por varias especies de *Fusarium*. Las especies de *Fusarium* que se encuentran principalmente en asociación en la fusariosis de la espiga en los cereales de grano pequeño son *F. graminearum* (*G. zaeae*), *F. avenaceum* y *F. culmorum* (Bottalico y Perrone, 2002), sin embargo *F. poae*, *F. tricinctum*, *F. sporotrichioides*, *F. equiseti* y *F. langsethiae* también son comúnmente encontrados (Kosiak *et al.*, 2003; Bottalico y Perrone, 2002).

F. verticillioides (*G. moniliformis*) y *F. proliferatum* (*G. intermedia*) también provoca pudriciones de tallo y raíz (Bottalico, 1998; Leslie *et al.*, 1990; Nelson *et al.*, 1981). Estos patógenos pueden ser muy agresivos en climas templados. La infección se puede propagar por el suelo y las semillas que portan el inóculo, pero por lo general la invasión del patógeno se da a través del micelio o de los granos dañados por insectos (Munkvold, 2003). La pudrición de la mazorca no sólo reduce la cantidad de granos, sino también su calidad, ya que ambos patógenos producen micotoxinas (Bottalico *et al.*, 1989; Moretti *et al.*, 1995). La disponibilidad de métodos para identificar taxonómicamente estos patógenos de importancia es

un elemento esencial y un requisito para este propósito y consecuencias de las micotoxinas.

Tanto *F. verticillioides* como *F. proliferatum* pertenecen al complejo de especies *G. fujikuroi*, en el que al menos existen once poblaciones de apareamiento diferentes, es decir, especies biológicas. (Leslie y Summerell 2006). Entre el complejo de especies de *G. fujikuroi* que son patógenas para el maíz, *F. verticillioides* y *F. proliferatum* se distinguen por sus cadenas de microconidios (no formado por *F. subglutinans*), y además en la presencia de polifialides que diferencia *F. proliferatum* de *F. verticillioides* (Nirenberg y O'Donnell 1998).

Como la identificación morfológica requiere de mano de obra especializada y consume mucho tiempo para generar un diagnóstico preciso a nivel de especies, las secuenciación de ADN de varios genes en la actualidad se está utilizando más a menudo (O'Donnell *et al.*, 1998).

La distinción morfológica entre *F. verticillioides* y *F. proliferatum* es bastante refinada y requiere de personal capacitado para reconocerlas. Genotipos basados en PCR ofrecen una mejor relación costo-beneficio en el diagnóstico molecular. Los primers que amplifican específicamente del ADN de *F. verticillioides* han sido diseñados basados en la variación de la secuencia dentro de los espacios intergénomicos (IGS); la región del locus ribosomal (Patiño *et al.*, 2004) o el gen de la calmodulina (Mule *et al.*, 2004). Del mismo modo, ha sido posible diseñar primers específicos a *F. proliferatum* (Jurado *et al.*, 2006) a la calmodulina (Mule *et al.*, 2004).

Además de los análisis de ADN mediante PCR, un estudio complementario para el diagnóstico no sólo de especies de hongos, es la Microscopia Electrónica de Barrido, la cual utiliza un haz de electrones en lugar de un haz de luz para formar una imagen (Ojeda, 1997). Tiene una gran profundidad de campo, la cual permite que se enfoque a la vez una gran parte de la muestra. También produce imágenes de alta resolución que significa que características espacialmente cercanas en la muestra pueden ser examinadas a una alta magnificación (Von, 1938).

En el microscopio electrónico de barrido la muestra generalmente es recubierta con una capa de carbono o una capa delgada de un metal como el oro, para darle propiedades conductoras a la muestra. Posteriormente, se barre la muestra con electrones acelerados que viajan a través del cañón. Un detector mide la cantidad de electrones enviados que arroja la intensidad de la zona de muestra, siendo capaz de mostrar figuras en tres dimensiones, proyectados en una imagen digital (Von, 1938).

En este tipo de análisis es necesario acelerar los electrones en un campo eléctrico, para aprovechar de esta manera su comportamiento ondulatorio, lo cual se lleva a cabo en la columna del microscopio, donde se aceleran mediante una diferencia de potencial de 1000 a 30,000 voltios. Los electrones acelerados por un voltaje pequeño se utilizan para muestras muy sensibles, como podrían ser las muestras biológicas, y de esta manera se aprovecha la menor longitud de onda para tener una mejor resolución (Von, 1938; Bozzola y Rusell, 2004).

Los electrones acelerados salen del cañón, y se enfocan mediante las lentes condensadora y objetiva, cuya función es reducir la imagen del filamento, de manera que incida en la muestra un haz de electrones lo más pequeño posible. Con las bobinas deflectoras se barre este fino haz de electrones, punto por punto y línea por línea. Cuando el haz incide sobre la muestra, se producen muchas interacciones entre los elementos del mismo haz, y los átomos de la muestra; puede haber, por ejemplo, electrones que reboten como las bolas de billar. Por otra parte, la energía que pierden los electrones al “chocar” contra la muestra puede hacer que otros electrones salgan despedidos y producir rayos X. El más común de estos es el que detecta electrones secundarios, y es con el que se hace la mayoría de las imágenes de Microscopios de barrido. (Von, 1938; Bozzola y Rusell, 2004).

Pequeños detalles en los hongos imperfectos, en especial la ornamentación, la forma y el tamaño de los conidios, constituyen elementos básicos para diferenciar entre especies e incluso entre variedades y formas específicas de hongos (Ojeda, 1997).

Existe una controversia sobre cuál es el método más adecuado para preparar hongos para la microscopía electrónica de barrido. Algunos autores consideran que los métodos que utilizan la fijación química y la desecación por punto crítico producen retracciones e incluso colapsos de sus estructuras (Agudelo *et al.*, 1992), por lo que sería preferible utilizar métodos de microscopía electrónica de baja temperatura. Sin embargo, si se realiza correctamente tanto la fijación como el punto crítico puede evitarse el desarrollo de imperfecciones (Ojeda, 1997).

OBJETIVOS

1. Identificar la ó las especies del genero *Fusarium spp.* involucrados en la pudrición de raíz y espiga blanca del trigo mediante el uso de técnicas de microscopía electrónica y PCR.

HIPÓTESIS

1. Las especies *Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, *F. equisetii*, *F. verticillioides* y *F. proliferatum*, son las que mayor incidencia tienen en el área de Pénjamo, Guanajuato, por lo que se cree que alguna de estas especies está causando los síntomas de espiga blanca y pudrición de raíz en trigo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se colectaron muestras vegetales de trigo de la variedad Cortázar S94 en el año 2012 en la localidad de Tepetate de Negrete, Pénjamo, Guanajuato, y se realizaron aislamientos para observar los patógenos que presentan mayor incidencia y que están causando los síntomas de espiga blanca y pudrición de raíz en cultivos de trigo.

A partir de los aislamientos obtenidos de las partes vegetales infectadas (Schaad *et al.*, 2012), fueron transferidos los hongos con mayor incidencia a cajas petri, sembrados en medios de cultivo agua agar para asegurar la esporulación de macroconidios y microconidios (French y Hebert, 1992), colocados 24 hrs en luz, en la mañana y tarde aprovechando la luz solar y su correspondiente horas de luz blanca mediante focos eléctricos por un lapso de 12–15 días.

Procesamiento de muestras para observar al Microscopio Electrónico de Barrido

Ya que se pudo corroborar la esporulación de los aislamientos de *Fusarium* spp. observando las cajas Petri con Agua Agar bajo el microscopio compuesto, se cortaron fragmentos de 5 × 5 mm con una navaja de disección esterilizada, de las placas de agar con los diferentes aislamientos de 12 días de crecimiento, para la observación de las estructuras reproductivas de los hongos (Bozzola y Rusell, 2004).

Dichas muestras se fijaron en glutaraldehído 2.5% en amortiguador de fosfatos Sorensen's 0.1M pH 7.2 (Bozzola y Rusell, 2004) durante 24 hrs. Posteriormente se realizaron tres lavados seriados con amortiguador de fosfatos antes mencionado, cinco minutos en cada cambio.

Los tejidos se deshidrataron en una serie de concentraciones de etanol graduales (30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% y 90%) por 45 min en cada una y finalmente en

etanol absoluto tres veces, 20 min entre cada cambio. Las muestras se secaron en una secadora de punto crítico (Samdri-780A); una vez secas se colocaron y orientaron sobre porta muestras usando una cinta doble adhesiva de carbón y se recubrieron con oro durante 4 minutos en una ionizadora (Ion Sputter JFC-1100, Jeol, Fine Coat) (Bozzola y Rusell, 2004).

Las muestras se observaron en un Microscopio Electrónico de Barrido (JEOL JSM 6390) para la toma de micrografías.

Por último se realizó el cálculo de la media de ancho y largo para Macroconidios y Microconidios, tomando como muestras las medidas de 30 Macroconidios y 30 Microconidios.

Identificación molecular

Se realizó una extracción de ADN al micelio de 12 días de crecimiento en Medio de cultivo PDA, en 3 repeticiones (cajas Petri) con los aislamientos originales y los re-aislamientos obtenidos al comprobar los postulados de Koch. Para la extracción de ADN se utilizó el protocolo recomendado por el fabricante del kit DNeasy (Qiagen^{MR}) y el ADN fue almacenado a -20°C para su uso posterior en las pruebas de PCR (Qiagen, 2012).

Se realizaron amplificaciones por PCR en 3 regiones universales de hongos y específicas de *Fusarium*. Una de estas regiones corresponde a los espaciadores internos transcritos o ITS, además de los genes que codifican para el factor de elongación y la calmodulina (Cuadro 1).

Cuadro 1. Primers utilizados para la amplificación del ADN aislado a partir de micelio de *Fusarium spp.*

Primer	Secuencia 5'-3'	Objetivo	Referencia
ITS-1	tccgtaggtgaacctgcgg	ITS	White <i>et al.</i> (1990)
ITS-4	tcctccgcttattgatatgc	ITS	
EF-1	atgggtaagga(a/g)gacaagac	Factor de elongación	O'Donnell <i>et al.</i> (1998)
EF-2	gga(a/g)gtaccagt(g/c)atcatggt		
CL1	gartwcaaggaggccttctc	Calomdulina	
CL2A	tttgcatcatgagttggac		
PRO-1	ctttccgccaagtttctc	<i>F. proliferatum</i>	Mulé <i>et al.</i> (2004)
PRO-2	tgtcagtaactcgacgttggtg		
VER-1	cttcctgcgatgtttctcc	<i>F. verticillioides</i>	
VER-2	aattggccattggtattatatatcta		
SUB-1	ctgctgctaacctctttatcca	<i>F. subglutinans</i>	
SUB-2	cagtatggacggttggtattatatctaa		
proITS-R	gcttgccgcaagggctcgc	<i>F. proliferatum</i>	Visentin <i>et al.</i> (2009)
verITS-F	aaatcgcggtccccaattga	<i>F. verticillioides</i>	

Los primers PRO1/PRO2; VER1/VER2 y SUB1/SUB2 (Mulè *et al.*, 2004) son específicos a *F. proliferatum*, *F. verticillioides* y *F. subglutinans* respectivamente.

Además de estos primers se utilizaron verITS-F y proITS-R diseñados para la discriminación entre *F. proliferatum* y *F. verticillioides* (Visentin, *et al.*, 2009), ambos son utilizados en combinación con los primers universales ITS1/ ITS4 (White *et al.*, 1990).

Los primers fueron sintetizados en la Compañía Integrated DNA Technologies (IDT). Todas las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador MJ

Research (modelo PTC-150) con una mezcla de reacción en un volumen final de 25 μ L, cuyos componentes fueron: 1X de Buffer de PCR, 200 μ M c/u dNTP's, 10 pmoles de primer antisentido, 10 pmoles de primer sentido, 1 unidad de *Taq* DNA polimerasa (Promega), 2 mM de $MgCl_2$ y se completó el volumen con agua libre de nucleasas (Agua grado Mili-Q). El programa utilizado en el caso de los ITS y el gen de la calmodulina consistió en una temperatura de 94 °C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos a 94-55-72 °C durante 20-25-50 segundos y una extensión final de 5 min a 74 °C. Para la amplificación del factor de elongación (EF) y la discriminación entre *F. proliferatum*, *F. subglutinans* y *F. verticillioides*, se siguió el programa 95-50-72 durante 50"-50"-60" durante 35 ciclos (White *et al.*, 1990; Nazar *et al.*, 1991; Mulé *et al.*, 2004)

Al término de las reacciones de PCR, los productos fueron colocados en un gel de agarosa al 1.5% previamente teñido con 0.5 μ g μ l⁻¹ de bromuro de etidio, incluyendo un testigo negativo y un marcador de peso molecular ladder-100 (Axygen). Se observaron los resultados en un transiluminador de luz UV y fueron documentados en fotografías (Sambrook y Russel, 2001).

Los fragmentos amplificados por PCR con los primers EF-1/EF-2; ITS1/ITS4 y CL1/CL2A fueron secuenciados directamente y los resultados fueron comparados con las secuencias disponibles en el banco de genes (GenBank) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) del Instituto Nacional de Salud (NIH) de E.E.U.U. (Altschul *et al.*, 1997).

RESULTADOS

Microscopio Electrónico de Barrido

La toma de micrografías de la cepa que presentó mayor incidencia, mostró la formación de macroconidios, microconidios y polifialides típicas de *F. proliferatum* (Matsushima) Nirenberg. Los macroconidios son alargados de paredes delgadas, la célula apical es curvada y la célula basal está mal desarrollada generando de 3 - 5 septas; los macroconidios varían de un medio de cultivo a otro, es por eso que para la localización de estas estructuras es necesaria la búsqueda en medios de cultivos frescos y que no hayan sido propagados para su conservación. En los macroconidios se observaron medidas de $24 - 33 \mu\text{m} \times 2 - 2.3 \mu\text{m}$ (Leslie y Summerell, 2006) (Figura 11).

Los microconidios tienen forma de tabique con la base aplanada y no tienen septas, (Leslie y Summerell, 2006). Estos microconidios se encuentran en cadena pero generalmente más cortos que los producidos por *F. verticillioides*, pero al contrario de estos, aquí se encuentran en polifialides, ya que esta característica es base para la distinción entre estas dos especies; además de esto, se encontraron estructuras a modo de clamidosporas, que Leslie y Summerell (2006) denominan como pseudoclamidosporas (Figura 12); los microconidios tienen medidas que van de $4.6 - 12 \mu\text{m} \times 1.60 - 2.5 \mu\text{m}$ (Figura 13).

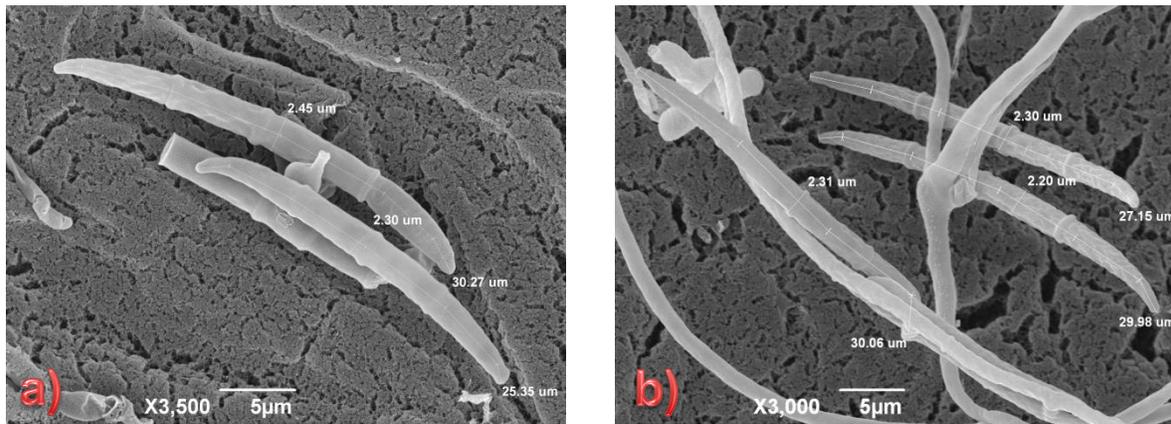


Figura 11.- Micrografías de Macroconidios pertenecientes a *F. proliferatum*; las micrografías fueron tomadas a un aumento de a) 3,500 X y b) 3,000 X. La morfología de los macroconidios coincide con lo que Leslie y Summerell (2006) mencionan para la especie en cuestión, macroconidios de 3-5 septas, célula apical curvada; y las medidas tomadas entran dentro del rango que el autor describe.

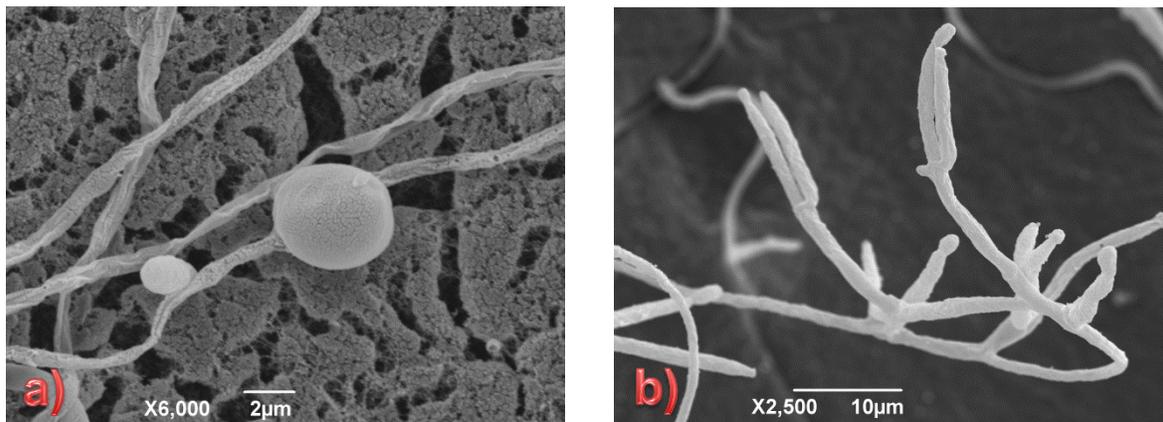


Figura 12.- Micrografías de a) Pseudoclamidospora y b) Polifialides; pertenecientes a *F. proliferatum*, las micrografías fueron tomadas a un aumento de 6,000 X y 2,500 X respectivamente. Leslie y Summerell (2006) mencionan que *F. proliferatum* no forma clamidosporas verdaderas, es por eso que para este caso se les denomina Pseudoclamidosporas, y a diferencia de *F. verticillioides*, esta especie *F. proliferatum*, forma polifialides.

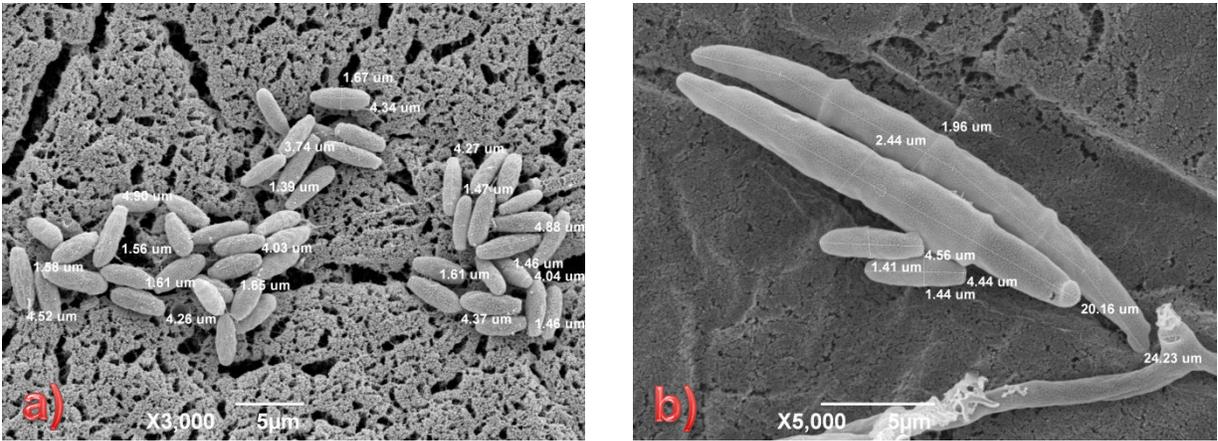


Figura 13.- Micrografías de Microconidios pertenecientes a *F. proliferatum*; las micrografías fueron tomadas a un aumento de a) 3,000 X y b) 5,000 X; en esta última se muestra la comparación de dos Macroconidios vs dos Microconidios. Los Microconidios son en forma de tabique de paredes delgadas y las medidas tomadas entran dentro del rango que Leslie y Summerell mencionan en el 2006.

Mediante el cálculo de medias para Macroconidios y Microconidios, se tomaron a 30 Macroconidios y 30 Microconidios como repeticiones, tomando las medidas de ancho y largo y así poder obtener una media que indique lo que Leslie y Summerell (2006) muestran para *F. proliferatum*; el análisis dio como resultados para el caso de los Macroconidios medias de 2.28 µm x 27.28 µm y para el caso de los Microconidios las medias van de 1.50 µm x 5.68 µm, estas medias entran dentro del rango que Leslie y Summerell (2006) reportan para esta especie; cabe recalcar que aunque las medidas para la especie *F. verticillioides* son casi idénticas, la diferencia morfológica predominante para diferenciar entre estas dos especies es la formación de Polifialides indicadas en la Figura 12 (Leslie y Summerell, 2006).

Identificación molecular

Se logró la amplificación del ADN con 5 pares de primers en 3 repeticiones de una cepa de *Fusarium* y otras 3 repeticiones de la cepa con mayor incidencia (85%) al realizar los postulados de Koch, aisladas a partir de necrosis de raíz de trigo en la zona de Pénjamo, Guanajuato.

Al utilizar los primers Universales para hongos de White *et al.* (1990), ITS1/ITS4, se obtuvieron fragmentos con una talla de entre 532 y 553 pb para las tres repeticiones (Figura 14). Las secuencias obtenidas de estos fragmentos fueron comparadas con GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) del Instituto Nacional de Salud (NIH) de E.E.U.U. (Altschul *et al.*, 1997) obteniendo un 99% de similitud para el género *Fusarium* spp. Este par de primers Universales son utilizados en general para hongos y las secuencias obtenidas en este caso no permitieron discriminar entre especies.

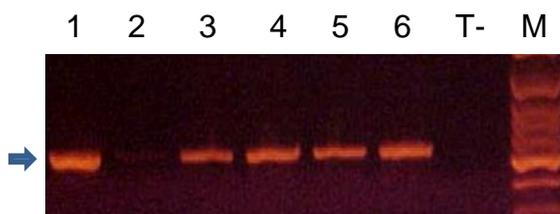


Figura 14.- Electroforesis en gel de agarosa con los productos obtenidos de la amplificación por PCR con los primers ITS1/ITS4 de 6 aislados de *Fusarium* spp. (1-6). La flecha señala los productos obtenidos de 532-553 pb aproximadamente. (M) marcador de peso molecular ladder-100 (Axygen).

Al utilizar los primers EF-1/EF-2 (O'Donnell *et al.*, 1998) que amplifican el gen que codifica para una proteína del factor de elongación, se obtuvieron productos de la talla esperada, entre 699 y 708 pb en todas las muestras analizadas (Figura 15). Las secuencias obtenidas fueron comparadas con el GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) del Instituto Nacional de Salud (NIH) de E.E.U.U. (Altschul *et al.*, 1997) y se obtuvo un 99% de similitud con las especies *F. proliferatum*, *F. intermedia* y *F. oxysporum*.

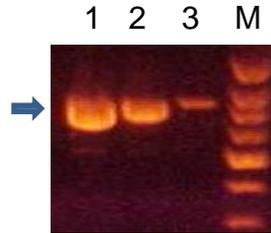


Figura 15.- Electroforesis en gel de agarosa con los productos obtenidos de la amplificación por PCR con los primers EF-1/EF-2 de 3 aislados de *Fusarium* spp (1-3). La flecha señala los productos obtenidos de 700 pb aproximadamente. (M) marcador de peso molecular ladder-100 (Axygen).

Cuando se usaron los primers PRO1/PRO2 específicos para *F. proliferatum*; VER1/VER2 específicos para *F. verticillioides* y SUB1/SUB2 para *F. subglutinans*; (Mulè *et al.*, 2004), las reacciones dieron positivas únicamente para *F. proliferatum* (Figura 16).

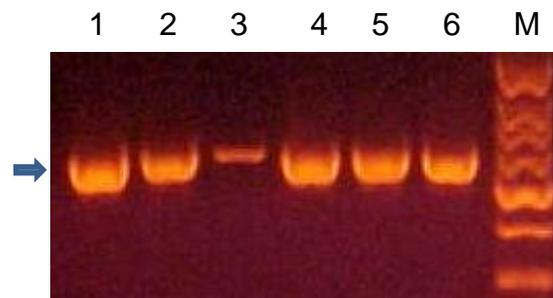


Figura 16.- Electroforesis en gel de agarosa con los productos obtenidos de la amplificación por PCR con los primers PRO-1/PRO-2 de 6 aislados de *Fusarium* spp. (1-6). La flecha señala los productos obtenidos de 585 pb. (M) marcador de peso molecular ladder-100 (Axygen).

Al someter las muestras de ADN con los primers diseñados por Visentin *et al.* (2009) en combinación con los ITS universales para hongos de White *et al.* (1990), se tuvo una reacción positiva en todas las muestras con los primers específicos a *F. proliferatum*, ITS-1/proITS-R (Figura 17), en cambio no hubo reacción con la combinación específica a *F. verticillioides* (datos no mostrados).

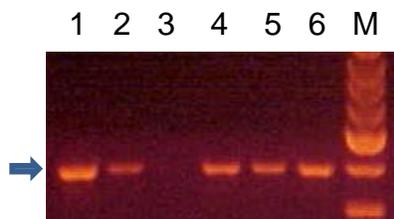


Figura 17.- Electroforesis en gel de agarosa con los productos obtenidos de la amplificación por PCR con los primers ITS-1/proITS-R de 6 aislados de *Fusarium* spp, (1-6). La flecha señala los productos obtenidos de 390 pb. (M) marcador de peso molecular ladder-100 (Axygen).

Al utilizar los primers CL1/CL2A (O'Donnell *et al.*, 1998), los cuales amplifican una secuencia del gen de la Calmodulina, las reacciones fueron positivas para las 6 muestras obteniéndose productos entre 751 y 755 pb, estas secuencias fueron comparadas con el GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) del Instituto Nacional de Salud (NIH) de E.E.U.U. (Altschul *et al.*, 1997), los resultados obtenidos muestran un 100% de similitud para *F. proliferatum* (Figura 18).

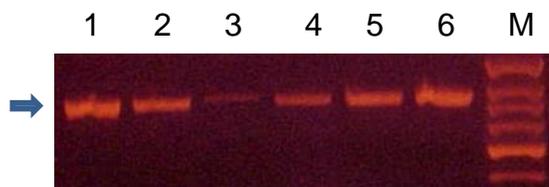


Figura 18.- Electroforesis en gel de agarosa con los productos obtenidos de la amplificación por PCR con los primers CL1/CL2A de 6 aislados de *Fusarium* spp (1-6). La flecha señala los productos obtenidos de 751-755 pb. (M) marcador de peso molecular ladder-100 (Axygen).

DISCUSIÓN

Los hongos fitopatógenos que fueron aislados en laboratorio con los síntomas de necrosis de raíz y espiga blanca de trigo, de acuerdo con las especies de predominancia son iguales a las que Contreras (1999) y Hernández (1992) reportan en algunos trabajos.

Las incidencias mostradas en el Capítulo 1 para *F. proliferatum* del 85% de los postulados de Koch, dieron indicios que esta especie era la causal de los síntomas de interés en el cultivo de trigo en la zona de Tepetate de Negrete en Pénjamo, Gto. (Wiese, 1987), siendo esta especie una más del género *Fusarium* que causa estos síntomas en el cultivo de trigo. Por la razón de haber obtenido una mayor incidencia en los postulados y para corroborar su identidad se realizaron las pruebas de Microscopia Electrónica (Ojeda, 1997), y las Pruebas de PCR para el género *Fusarium* (Leslie y Summerell, 2006).

Una vez que se realizaron las pruebas de microscopía electrónica, los resultados indicaron unas imágenes de macroconidios y microconidios muy similares en forma y tamaño a los que se reportan para *F. verticillioides* y *F. proliferatum*. (Leslie *et al.*, 2004). A diferencia de *F. verticillioides*, *F. proliferatum* forma cadenas de microconidios más cortas, aunque esto no es un carácter morfológico determinante, se puede corroborar esto, observando la formación de polifialides por parte de *F. proliferatum* (Leslie y Summerell, 2006). Estas características morfológicas se pueden observar en las micrografías mostradas. Además de esto, se pudo observar la formación de una estructura de resistencia por parte del patógeno aislado; se creía que esta estructura era una clamidospora, pero fue verificada y no es una clamidospora como tal, debido a que no cuenta con las características típicas de una clamidospora, de donde los autores la llaman pseudoclamidospora (Leslie y Summerell, 2006).

La toma de micrografías de este hongo mostró las estructuras reproductivas del patógeno, indicándonos macroconidios de 3-5 septas con medidas de 24 – 33 μm \times 2 – 2.3 μm , con la célula basal mal desarrollada y su célula apical curvada, los

microconidios eran pequeños con forma de tabique con medias de 4.6 – 12 μm x 1.60 - 2.5 μm , formados en cadenas cortas de microconidios y desarrollados a partir de polifialides como lo muestra la Figura 12 (b), dado que este carácter morfológico nos indica la diferencia principal entre *F. proliferatum* y *F. verticillioides* (Leslie y Summerell, 2006).

Con respecto al análisis molecular, los resultados de las secuencias amplificadas de los primers ITS1/ITS4 (White *et al.*, 1990), dieron un porcentaje muy aceptable del 99% para la identidad molecular del genero *Fusarium* spp. dado que estos primers son universales y no se puede guardar la confianza de que de la identidad molecular de la especie que se está investigando (White *et al.*, 1990), pero al utilizar los primers que codifican para el factor de elongación (EF-1/EF-2) (O'Donnell *et al.*, 1998), dieron resultados con similitudes del 99% para tres especies diferentes *F. proliferatum*, *F. intermedia* y *F. oxysporum*. Con esto no se puede dar un diagnóstico certero de cual sea la especie en particular, es por eso que se tuvo que recurrir a primers especiales que pudieran diferenciar entre especies.

Uno de esos pares de primers son PRO1 y PRO2, específicos para *F. proliferatum*; VER1 y VER2 usados para *F. verticillioides* y SUB1, SUB2 utilizados para *F. subglutinans*; (Mulè *et al.*, 2004). Estos primers diferencian en sus amplificaciones para esas tres especies, y en el caso de esta prueba de PCR dio positivas para *F. proliferatum*, y de donde no fue necesario corroborar por secuenciación debido a la especificidad de los oligos utilizados (Mulè *et al.*, 2004).

Otra prueba de PCR que se realizó con oligos muy específicos fue con los primers verITS-F y proITS-R (Vicentin *et al.*, 2009); estos iniciadores muy específicos para *F. proliferatum* y *F. verticillioides*, ayudan a discriminar estas dos especies, las cuales, como ya se indicó anteriormente son muy similares morfológicamente y si no se tienen buenas bases, es fácil confundirlas por la similitud de las estructuras (Leslie y Summerell, 2006). Las secuencias que fueron amplificadas por PCR, resultaron positivos a la especie *F. proliferatum* y negativos a la especie *F. verticillioides*, esta discriminación con oligos de especificidad son muy útiles en el

estudio molecular de especies fitopatógenas que mantengan similitud en sus estructuras reproductivas para la identificación (Vicentin *et al.*, 2009).

Finalmente la amplificación por PCR determinante para la identidad del hongo de estudio fue realizada con los primers de O'Donnell *et al.* (1998). Estos primers son CL1/CL2A, los cuales amplifican la secuencia del gen de la Calmodulina. Los productos amplificados fueron secuenciados y se obtuvo una similitud del 100% con *F. proliferatum* al comparar con el Gen Bank (Altschul *et al.*, 1997).

CONCLUSIONES

La especie que mostró mayor incidencia al realizar los postulados de Koch fue *F. proliferatum*; esta identidad fue corroborada con las pruebas de Microscopía Electrónica, PCR y secuenciación de ADN.

Se obtuvieron medidas de las estructuras reproductivas que entraban dentro del rango que algunos autores reportaban para la especie en cuestión, mediante las tomas de micrografías se pudieron observar las estructuras y morfología de macroconidios y microconidios típicos de *F. proliferatum*, además de observar Polifialides para diferenciar de *F. verticillioides*, donde esta última forma monofialides.

Referente a las secuencias amplificadas por PCR, se pudo comprobar la especie que tenía una incidencia mayor, ya que en dos pruebas discriminatorias resultó positivo a *F. proliferatum* y en una prueba del gen de la Calmodulina la secuencia tuvo un 100% de similitud con secuencias de *F. proliferatum* en el Gen Bank; con estas pruebas moleculares se pudo verificar que la especie que se encuentra en la zona de Tepetate de Negrete en Pénjamo, Guanajuato, y que se encuentra causando los síntomas de espiga Blanca y pudrición de raíz en trigo es *F. proliferatum*.

BIBLIOGRAFÍA

Agudelo M.C.M., Chica S.J., Yung S.J.B., 1992. Procesamiento de hongos para Microscopía Electrónica de rastreo a partir de microcultivos: Evaluación de los métodos descritos. Tesis Bacteriólogo Universidad de los Andes.

Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D.J. Lipman 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

Bottalico A, Logrieco A, Visconti A, 1989. Fusarium species and their mycotoxins in infected corn in Italy. *Mycopathologia* 107: 85–92.

Bottalico, A., Perrone, G., 2002. Toxigenic Fusarium species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *Eur. J. Plant Pathol.* 108, 611–624.

Bottalico A, 1998. Fusarium disease of cereals: species complex and related mycotoxin profiles, in Europe. *European Journal of Plant Pathology* 80: 85–103.

Bozzola, J. J.; Russell, D. L. 2004. *Electron Microscopy. Principles and techniques for biologists.* Jones and Bartlett Publishers, England pp. 16-63, 332-356.

Contreras, M. O. 1999. Efecto de las enfermedades foliares y transmisión por semilla en cereales de grano pequeño en ambientes húmedos de temporal. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Méx. 49p.

French, R.E., Hebert T.T., 1992. *Métodos de Investigación Fitopatologica IICA* Volumen 43 289 p.

Hernández R. R. 1992. Identificación y cuantificación de patógenos asociados a la semilla de trigo (*Triticum aestivum* L.) asperjado con fungicidas en campo de Juchitepec, México. Tesis de licenciatura, Ingeniero Agrónomo Especialista en Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo México. 43 Pp.

Jurado M, Vázquez C, Marín S, Sanchis V, González-Jaén MT, 2006. PCR-based strategy to detect contamination with mycotoxigenic *Fusarium* species in maize. *Systematic and Applied Microbiology* 29: 681–689.

Kosiak, B., M. Torp, E. Skjerve, and U. Thrane. 2003. The prevalence and distribution of *Fusarium* species in Norwegian cereals: A survey. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B: Soil and Plant Science* 53: 168-176.

Leslie JF, Pearson CA, Nelson PA, Toussoun TA, 1990. *Fusarium* spp. from maize, sorghum, and soybean fields in the central and eastern United States. *Phytopathology* 86: 343–350.

Leslie, F. J., Summerell, A. B. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing 369 pp.

Leslie, J. F., K. A. Zeller, M. Wohler, and B. A. Summerell. 2004. Interfertility of two mating populations in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *European Journal of Plant Pathology* 110: 610-618.

Moretti, A., A. Logrieco, A. Bottalico, A. Ritieni, G. Randazzo, and P. Corda. 1995. Beauvericin production by *Fusarium subglutinans* from different geographical areas. *Mycological Research* 99: 282-286.

Moretti, A., G. Mulè, A. Susca, M. T. González-Jaén, and A. Logrieco. 2004. Toxin profile, fertility and AFLP analysis of *Fusarium verticillioides* from banana fruits. *European Journal of Plant Pathology* 110: 601-609.

Mule´ G, Susca A, Stea G, Moretti A, 2004. A species-specific PCR assay based on the calmodulin partial gene for the identification of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. subglutinans*.

Munkvold G, 2003. Epidemiology of *Fusarium* diseases and their mycotoxins in maize ears. *European Journal of Plant Pathology* 109: 705–713.

Nazar, R.N., X. Hu, J. Schmide, D. Gelham, and J. Robb 1991. Potential use of PCR amplified ribosomal intergenic sequences in detection and differentiation of *Verticillium* wilt pathogens. *Physiol. and Mol. Plant Pathol.* 39:1-11.

Nelson PE, Toussoun TA, Cook RJ, 1981. *Fusarium: disease, biology and taxonomy.* Pennsylvania State University Press, University Park and London, USA. *European Journal of Plant Pathology* 110: 495–502.

Nicolaisen. M., Supronienė S., Kærsgaard N. L., Lazzaro, I., Henrik S. N., Fejer J. A. 2008. Real-time PCR for quantification of eleven individual *Fusarium* species in cereals 8pp.

Nirenberg HI, O'Donnell K, 1998. New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* complex. *Mycologia* 90: 434–458.

O'Donnell, K., Kistler, H. C., Cigelnik, E., and Ploetz, R. C. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:2044-2049.

Ojeda S.J.L., 1997. *Métodos de Microscopía Electrónica de barrido en Biología* ed. Universidad de Cantabria, 268 pp.

Patiño B, Mirete S, González-Jaén MT, Mule´ G, Rodríguez MT, Vázquez C, 2004. PCR detection assay of fumonisin-producing *Fusarium verticillioides* strains. *Journal of Food Protection* 67: 1278–1283.

Qiagen. 2012. DNeasy Plant Mini. Bench Protocol.

Sambrook, J. and D.W. Russell. 2001. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

Schaad, N.W., Jones, J.B., and Chun, W. 2002. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria.* American Phytopathological Society. Third Edition. APS Press. 373 p.

Visentin, I., G. Tamietti, D. Velentino, E. Portis, P. Karlovsky, A. Moretti, and F. Cardinale. 2009. The ITS region as a taxonomic discriminator between *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum*. *Mycological Research* 113:1137–1145.

Von Ardenne, Manfred (1938). Das Elektronen-Rastermikroskop. Praktische Ausführung. *Zeitschrift für technische Physik* 19: pp. 407–416.

White TJ, Burns T, Lee S, Taylor JW, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds), *PCR Protocol: a guide to methods and application*. Academic Press, Inc., New York, USA, pp. 315–322.

Wiese, M. V. 1987. *Compendium of wheat diseases*. The American Phytopathological Society. 2^a edición. 112p.

CONCLUSIONES GENERALES

Las diferentes maneras de identificación que se realizaron en este trabajo, mostraron que *F. proliferatum* y *F. graminearum* son los agentes causales de los síntomas de espiga blanca y pudrición de raíz en trigo en la zona de Tepetate de Negrete, Pénjamo, Guanajuato. La identificación morfológica ubicó a *F. graminearum* con incidencias del 40% en los postulados de Koch y un 85% para el caso de *F. proliferatum*, lo que indica que *F. proliferatum* es la especie predominante que causa los síntomas de interés.

El análisis estadístico de 28 variedades de trigo dio como resultado a las variedades Castrejón F97 y Gálvez M87, como las más tolerantes al conjunto de las cuatro variables, porcentaje de germinación, porcentaje de necrosis, longitud de raíz y longitud de follaje. Por otro lado, las variedades más susceptibles a la inoculación por *Fusarium* spp fueron Monarca F2007 y Bátán F96, las cuales, mostraron un grado mayor de necrosis en la raíz y un bajo grado de germinación.

Los datos usados en los análisis estadísticos fueron tomados en condiciones de laboratorio, donde se mantuvieron humedades relativas del 100% por 12 días, asegurando la expresión de signos y síntomas, por lo que la enfermedad en condiciones de campo podría variar debido a que no son condiciones idóneas como las de invernadero.

Las pruebas de microscopía electrónica mostraron micrografías de los macroconidios y microconidios de la especie predominante, así como la formación de fialides similares a las que forman *F. verticillioides* y *F. proliferatum*, pero dado que se encontró la formación de polifialides y pseudoclamidosporas, se pudo deducir que se trataba de *F. proliferatum*, ya que *F. verticillioides* forma monofialides.

Por último, las pruebas de PCR utilizadas para llegar a la especie fueron con los pares de primers discriminatorios PRO1/PRO2; VER1/VER2; SUB1/SUB2 (Mulè *et al.*, 2004) las cuales dieron positivas para *F. proliferatum*; y los pares de primers verITS-F/proITS-R (Vicentin *et al.*, 2009) donde de igual forma dieron positivos

para *F. proliferatum*. En estas amplificaciones por PCR no es necesaria la secuenciación debido a que los oligos son específicos y se pueden observar los positivos y negativos en el gel de agarosa. Una última prueba de PCR determinante fue con el par de primers CL1/CL2A (O'Donnell *et al.*, 1998), los cuales amplifican una secuencia del gen de la Calmodulina, donde los productos amplificados secuenciados obtuvieron una similitud del 100% con *F. proliferatum* al comparar con el Gen Bank (Altschul *et al.*, 1997).

BIBLIOGRAFÍA CITADA EN INTRODUCCIÓN GENERAL

Agrios, G.N. 2006. Fitopatología. 2ª. Ed. Editorial Limusa. México: 447 p.

Bacon, C. W., and P. E. Nelson. 1994. Fumonisin production in corn by toxigenic strains of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum*. *Journal of Food Protection* 57: 514-521.

Bacon, C. W., I. E. Yates, D. M. Hinton, and F. Meredith. 2001. Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize. *Environmental Health Perspectives* 109 (Suppl. 2): 325-332.

Bishop, D. L. 2002. Gene expression of a vacuolar peroxidase with stress-induced pathogenesis in wheat sheaths. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 61: 65-71.

Bishop, D. L., N. J. Chatterton, P. A. Harrison, and R. D. Hatfield. 2002. Changes in carbohydrate coordinated partitioning and cell wall remodeling with stress-induced pathogenesis in wheat sheaths. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 61: 53-63.

Braun HJ, Atlin G, Payne T. 2010. Multi-location testing as a tool to identify plant response to global climate change. In *Climate Change and Crop Production*, ed. MP Reynolds, pp. 115–38. London, UK: CABI

Brown JKM, Hovmøller MS. 2002. Aerial dispersal of pathogens on the global and continental scales and its impact on plant disease. *Science* 297:537–41

Burgess, L. W., P. E. Nelson, T. A. Toussoun, and W. F. O. Marasas. 1985. *Fusarium scirpi*: Emended description and notes on geographic distribution. *Mycologia* 77: 212-218.

Burgess, L. W., and D. Trimboli. 1986. Characterization and distribution of *Fusarium nygamai*, sp. nov. *Mycologia* 78: 223-229.

Caldwell RM. 1968. Breeding for general and/or specific plant disease resistance. In *Proceedings of the 3rd International Wheat Genetics Symposium*, ed. KWF Inlay, KWShepherd, pp. 263–72. Canberra, Australia: Publ. Aust. Acad. Sci.

Carter, J. P., H. N. Rezanoor, D. Holden, A. E. Desjardins, R. D. Plattner, and P. Nicholson. 2002. Variation in pathogenicity associated with the genetic diversity of *Fusarium graminearum*. *European Journal of Plant Pathology* 108: 573-583.

Castañeda, A. 2006. Especies de *Helminthosporium* asociadas a la semilla de cebada (*Hordeum vulgare*) en los Valles Altos de México. CHAPINGO. México. 42 pp.

Clear, R. M., and S. K. Patrick. 1992. A simple medium to aid the identification of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum*, and *Fusarium subglutinans*. *Journal of Food Protection* 55: 120-122.

Clements, M. J., C. E. Kleinschmidt, C. M. Maragos, J. K. Pataky, and D. G. White. 2003. Evaluation of inoculation techniques for *Fusarium* ear rot and fumonisin contamination of corn. *Plant Disease* 87: 147-153.

Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato, A. C. (CESAVEG). 2013. Principales especies de *Fusarium* spp., en el cultivo del trigo. Informe Técnico.

Contreras, M. O. 1999. Efecto de las enfermedades foliares y transmisión por semilla en cereales de grano pequeño en ambientes húmedos de temporal. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Méx. 49p.

Cotten, T. K., and G. P. Munkvold. 1998. Survival of *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum*, and *F. subglutinans* in maize stalk residue. *Phytopathology* 88: 550-555.

Desjardins, A. E., A. M. Jarosz, R. D. Plattner, N. J. Alexander, D. W. Brown, and J. E. Jurgenson. 2004. Patterns of trichothecene production, genetic variability, and virulence to wheat of *Fusarium graminearum* from smallholder farms in Nepal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 6341- 6346.

Fisher, N. L., W. F. O. Marasas, and T. A. Toussoun. 1983. Taxonomic importance of microconidial chains in *Fusarium* section *Liseola* and effects of water potential on their formation. *Mycologia* 75: 693-698.

Gilbert, J., R. L. Conner, M. R. Fernandez, D. McLaren, and S. M. Woods. 2003. Role of spring wheat seed infested with *Fusarium graminearum* in spread and development of Fusarium head blight and effects on agronomic performance. *Canadian Journal of Plant Pathology* 25: 73-81.

Gilbert, J., and W. G. D. Fernando. 2004. Epidemiology and biological control of *Gibberella zeae*/*Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 26: 464-472.

Gilchrist-Saavedra, L., G. Fuentes-Dávila, C. Martínez-Cano, R.M. López-Atilano, E. Duveiller, R.P. Singh, M. Henry e I. García A. 2005. Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada. Segunda edición. México, D.F.: CIMMYT. 68 pp.

González, M. y Pioli, R. 2001. Fusariosis en trigo: manejo y predicción de la enfermedad. SISTEMA DE INFORMACIÓN TÉCNICA. Consultado en diciembre del 2011. Disponible en URL: <http://www.fcagr.unr.edu.ar/Extension/Informes%20tecnicos/fusariosistrigo.htm>

Goswami, R. S., and H. C. Kistler. 2004. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology* 5: 515-525.

Hampton, J. G. 1980: Fungal pathogens in New Zealand certified wheat seed. N.Z. Journal of Experimental Agriculture 8: 301-304

Hernández R. R. 1992. Identificación y cuantificación de patógenos asociados a la semilla de trigo (*Triticum aestivum* L.) asperjado con fungicidas en campo de Juchitepec, México. Tesis de licenciatura, Ingeniero Agrónomo Especialista en Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo México. 43 Pp.

Hirata, T., E. Kimishima, T. Aoki, H. I. Nirenberg, and K. O'Donnell. 2001. Morphological and molecular characterization of *Fusarium verticillioides* from rotten banana imported into Japan. *Mycoscience* 42: 155-166.

INIA, Resultados de investigación "alternativas para un programa de producción de trigo de temporal, Celaya, Gto"., México, 1980.

Jackowiak, H., D. Packa, M. Wiwart, and J. Perkowski. 2005. Scanning electron microscopy of *Fusarium*-damaged kernels of spring wheat. *International Journal of Food Microbiology* 98: 113-123.

Joffe, A. Z., and J. Palti. 1977. Species of *Fusarium* found in uncultivated desert-type soils in Israel. *Phytoparasitica* 5: 119-122.

Kedera, C. J., J. F. Leslie, and L. E. Clafflin. 1994. Genetic diversity of *Fusarium* section *Liseola* (*Gibberella fujikuroi*) in individual maize plants. *Phytopathology* 84: 603-607.

Kerényi, Z., and L. Hornok. 2002. Structure and function of mating type genes in *Fusarium* species. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 49: 313-314.

Koch, N., and W. Huth. 1997. Interaction of barley yellow dwarf virus and *Fusarium culmorum* (W. G. Sm.) Sacc. in winter wheat. *Journal of Phytopathology* 145: 425-428.

Kommedahl, T., H. K. Abbas, P. M. Burnes, and C. J. Mirocha. 1988. Prevalence and toxigenicity of *Fusarium* spp. from soils of Norway near the Arctic Circle. *Mycologia* 80: 790-794.

Langevin, F., F. Eudes, and A. Comeau. 2004. Effect of trichothecenes produced by *Fusarium graminearum* during Fusarium head blight development in six cereal species. *European Journal of Plant Pathology* 110: 735-746.

Leslie-F. Jonh., Summerell-A. Brett. 2006. The Fusarium Laboratory Manual. Blackwell Publishing 369 pp

Leslie, J. F., K. A. Zeller, M. Wohler, and B. A. Summerell. 2004. Interfertility of two mating populations in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *European Journal of Plant Pathology* 110: 610-618.

Liddell, C. M., and L. W. Burgess. 1985. Survival of *Fusarium moniliforme* at controlled temperature and relative humidity. *Transactions of the British Mycological Society* 84:121-130.

Mandeel, Q. A. 1996. A survey of *Fusarium* species in an arid environment of Bahrain. IV. Prevalence of *Fusarium* species in various soil groups using several isolation techniques. *Cryptogamie Mycologie* 17: 149-163.

Marin, S., V. Sanchis, A. Teixido, R. Saenz, A. J. Ramos, I. Vinas, and N. Magan. 1996. Water and temperature relations and microconidial germination of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* from maize. *Canadian Journal of Microbiology* 42: 1045-1050.

Mathre, D., ed. 1997. *Compendium of Barley Diseases*, 2nd ed. APS Press, St. Paul, Minnesota.

Matsushima, T. 1971. *Microfungi of the Solomon Islands and Papua-New Guinea*. Nippon Printing Publication Co., Kobe, Japan.

Menkir, A., G. Ejeta, L. G. Butler, A. Melakeberhan, and W. H. Warren. 1996. Fungal invasion of kernels and grain mold damage assessment in diverse sorghum germplasm. *Plant Disease* 80: 1399-1402.

Morales-Rodríguez, I; Yáñez-Morales, M; Silva Rojas, HV; García de los Santos, G; Guzman de Peña, D. 2006. Biodiversity of *Fusarium* species in Mexico

associated with ear rot in maize, and their identification using a phylogenetic approach. *Mycopathologia* 163:31-39.

Moreno, M. H. 1996. Análisis físico y biológico de semillas agrícolas. Tercera edición. Universidad Nacional Autónoma de México. México, DF. 393p.

Moretti, A., G. Mulè, A. Susca, M. T. González-Jaén, and A. Logrieco. 2004. Toxin profile, fertility and AFLP analysis of *Fusarium verticillioides* from banana fruits. *European Journal of Plant Pathology* 110: 601-609.

Mulè, G., A. Susca, G. Stea, and A. Moretti. 2004. A species-specific PCR assay based on the calmodulin partial gene for identification of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. subglutinans*. *European Journal of Plant Pathology* 110: 495-502.

Munkvold, G. P., R. L. Helmich, and W. B. Showers. 1997. Reduced Fusarium ear rot and symptomless infection in kernels of maize genetically engineered for European corn borer resistance. *Phytopathology* 87: 1071-1077.

Nelson, P. E., T. A. Toussoun, and W. F. O. Marasas. 1983. *Fusarium Species: An Illustrated Manual for Identification*. Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania.

Nyvall, R. F., J. A. Percich, and C. J. Mirocha. 1999. Fusarium head blight of cultivated and natural wild rice (*Zizania palustris*) in Minnesota caused by *Fusarium graminearum* and associated *Fusarium* spp. *Plant Disease* 83: 159-164.

Nelson, P. E., L. W. Burgess, and B. A. Summerell. 1990. Some morphological and physiological characters of *Fusarium* species in sections *Liseola* and *Elegans* and similar new species. *Mycologia* 82: 99-106.

Nirenberg, H. I. 1976. Untersuchungen über die morphologische und biologische Differenzierung in der *Fusarium* Sektion *Liseola*. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt Für Land- und Forstwirtschaft (Berlin – Dahlem)* 169: 1-117.

Pena Bautista, R.J., Hernández Espinosa, N., Pérez Herrera, P., Villaseñor Mir, E., Gómez Valdez, M. M., Mendoza Lozano, M. A. 2008. Calidad de la cosecha de trigo en México. Cielo otoño-invierno 2006-2007. Publicación Especial del CONASIST-CONATRIGO, Tajín No. 567 Col. Vertiz Narvarte, Delegación Benito Juárez C.P. 03600 México, D.F. 28p..

Presscot, J.M. Burnett, P. A. Saari, Ransom, J. Browman, J. W. De Williano, Singn, R. P., Bekele, G. 1986. Enfermedades y plagas del trigo: Una guía para su identificación en campo. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. México, DF. 135p.

Rosegrant MW, Agcaoili-Sombilla M, Perez ND. 1995. Global food projections to 2020: implications for investment. *Food, Agriculture and the Environment Discussion, Paper 5*. Washington, DC: Intl. Food Policy Res. Inst. 54 pp.

Saremi, H., L. W. Burgess, and D. Backhouse. 1999. Temperature effects on the relative abundance of *Fusarium* species in a model plant-soil ecosystem. *Soil Biology and Biochemistry* 31: 941-947.

SARH. 1992. Guía Fitosanitaria para el cultivo de Trigo. Serie Sanidad Vegetal. Sistema Producto Trigo. 1-18 pp. y 3-48 pp

Seifert, K. A., Aoki, T., Baayen, R. P., Brayford, D., Burgess, L. W., Chulze, S., Gams, W., Geiser, D., Gruyter, D. J., Leslie, J. F., Logrieco, A., Marasas, W. F. O., Nirenberg, H. I., O'Donnell, K., Rheeder, J. P., Samuels, G. J., Summerell, B. A., Thrane, U., and Waalwijk, C. 2003. The name *Fusarium moniliforme* should no longer be used. *Mycological Research* 107: 643-644.

SIACON. 2006. Sistema de Información Agropecuaria de Consulta. Anuario estadístico de la producción agrícola. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). México. <http://www.w3.siap.sagarpa.gob.mx>. (6 de octubre, 2006).

SIACON. 2010. Sistema de Información Agropecuaria de Consulta 2010 (SIACON). Descargado el 13 de diciembre del 2011. Disponible en

URLL:http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=286&Itemid=428.

Sobek, E. A., and G. P. Munkvold. 1999. European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) larvae as vectors of *Fusarium moniliforme*, causing kernel rot and symptomless infection of maize kernels. *Journal of Economic Entomology* 92: 503-509.

Solís M., E.; Salazar Z., A.; Huerta E., J.; Villaseñor M., H. E.; Espitia R., E. y Ramírez. R., A. 2003. Bárcenas S2002; nueva variedad de trigo harinero para El Bajío. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Experimental Bajío. Celaya, Guanajuato, México. 24 p. (Folleto Técnico Núm. 1).

Solís M., E.; Huerta E., J.; Pérez H., P.; Ramírez R., A.; Villaseñor M., H. E. 2008 Urbina S2007: Nueva Variedad de Trigo Harinero para la Región “El Bajío” Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Experimental Bajío. Celaya, Guanajuato, México. 6 p. (Folleto Técnico Núm. 1 Volumen 34)

Soonthornpoc, P., L. E. Trevathan, and D. Ingram. 2000. The colonization of maize seedling roots and rhizosphere by *Fusarium* spp. in Mississippi in two soil types under conventional tillage and no-tillage systems. *Phytoprotection* 81: 97-106.

Tekauz, A., B. McCallum, N. Ames, and J. M. Fetch. 2004. *Fusarium* head blight of oat – Current status in western Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology* 26: 473-479.

Thrane, U. 1990. Grouping *Fusarium* section *Discolor* isolates by statistical analysis of quantitative high performance liquid chromatographic data on secondary metabolite production. *Journal of Microbiological Methods* 12: 23-40.

Tiedt, L. R., and W. J. Jooste. 1988. Ultrastructure of collarette formation in *Fusarium* section *Liseola* and some taxonomic implications. *Transactions of the British Mycological Society* 90: 531-536.

Toth, B., A. Mesterhazy, P. Nicholson, J. Teren, and J. Varga. 2004. Mycotoxin production and molecular variability of European and American isolates of *Fusarium culmorum*. *European Journal of Plant Pathology* 110: 587-599.

Tschanz, A. T., R. K. Horst, and P. E. Nelson. 1976. The effect of environment on sexual reproduction of *Gibberella zeae*. *Mycologia* 68: 327-340.

Vargas Ledesma, Norma Gabriela. 2006. Hongos asociados a la semilla de trigo (*Triticum aestivum* L.) de riego, en el Valle de Santiago, Guanajuato. Tesis de Licenciatura. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 77 pp.

Waalwijk, C., P. Kastelein, I. de-Vries, Z. Kerenyi, T. van der Lee, T. Hesselink, J. Kohl, and G. Kema. 2003. Major changes in *Fusarium* spp. in wheat in the Netherlands. *European Journal of Plant Pathology* 109: 743-754.

Waalwijk, C., R. van der Heide, I. de Vries, T. van der Lee, C. Schoen, G. Costrel de Corainville, I. Hahn, P. Kastelein, J. Kohl, P. Lonnet, T. Demarquet, and G. H. J. Kema. 2004. Quantitative detection of *Fusarium* species in wheat using TaqMan. *European Journal of Plant Pathology* 110: 481-494.

Wiese, M. V. 1987. Compendium of wheat diseases. The American Phytopathological Society. 2ª edición. 112p

White, D. G., ed. 1999. *Compendium of Corn Diseases*, 3rd ed. APS Press, St. Paul, Minnesota.

Wicklow, D. T., B. W. Horn, O. L. Shotwell, C. W. Hesseltine, and R. W. Caldwell. 1988. Fungal interference with *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin contamination of maize grown in a controlled environment. *Phytopathology* 78: 68-74.

Xue, A. G., K. C. Armstrong, H. D. Voldeng, G. Fedak, and C. Babcock. 2004. Comparative aggressiveness of isolates of *Fusarium* spp. causing head blight on wheat in Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology* 26: 81-88.

Young, T. R., and T. A. Kucharek. 1977. Succession of fungal communities in roots and stalks of hybrid field corn grown in Florida, USA. *Plant Disease Reporter* 61:76-80.

Zillinsky, F.J. 1984. Guía para la Identificación de Enfermedades en Cereales de Grano Pequeño. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. CIMMYT. México, D.F. 141p.

Anexos

Anexo 1.- Variedades utilizadas para el Análisis Estadístico de los Postulados de Koch.

1.- ALTIPLANO F 2007 T	2.- BARCENAS S 2000 RB	3.- BÁTÁN F 96 T	4.- CASTREJON F 97 RB
5.- CHICALOTE F T	6.- CORTAZAR S 94 RB	7.- DON CARLOS T	8.- ENEIDA F94 RB
9.- GALVEZ M87 T	10.- JOSECHA F 2007 RB	11.- KRONSTAD F 2004 RN	12.- MAYA S 2007 RB
13.- MONARCA F 2007 RB	14.- NAHUALT F 2000 T	15.- NANA F 2007 T	16.- NORTEÑA F 2007 RBW
17.- PALMERIN F 2004 RNW	18.- REBECA F 2000 T	19.- ROELFS F 2007 R-NW	20.- SALAMANCA S 86 RB
21.- SANTA LUCIA	22.- TACUPETO F 2001 RNW	23.- TEMPORALERA M 87 T	24.- TLAXCALA F 2000 T
25.- TOBARITO M 97 RB	26.- TOROCAHUI S 2004 RNW	27.- TRIUNFO F 2004 T	28.- URBINA S 2007 RB