



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



FACULTAD DE AGROBIOLOGIA PRESIDENTE "JUAREZ"

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA TEMÁTICA: FISILOGIA Y GENÉTICA VEGETAL

TESIS

Como requisito para obtener el grado de:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**CARACTERIZACIÓN DE *Fusarium* spp., FITOPATÓGENO DE ARÁNDANO
(*Vaccinium corymbosum* L.)**

ROBERTO CARLOS MÉNDEZ DÍAZ

Tutora: Dra. en el área de Ciencias Agrícolas
MA. BLANCA NIEVES LARA CHÁVEZ

Uruapan, Michoacán julio del 2019





UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

DRA. LILIANA MÁRQUEZ BENAVIDES
COORDINADORA GENERAL DEL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T E

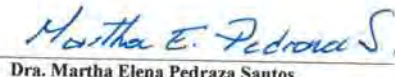
Por este conducto nos permitimos comunicarle que después de haber revisado el manuscrito final de la Tesis Titulada: "CARACTERIZACIÓN DE *Fusarium* spp., FITOPATÓGENO DE ARÁNDANO (*Vaccinium corymbosum* L)" presentado por el Ing. Roberto Carlos Méndez Díaz con Número de Matrícula 0964287E, consideramos que reúne los requisitos suficientes para ser publicado y defendido en Examen de Grado de Maestro en Ciencias.

Sin otro particular por el momento, reiteramos a usted un cordial saludo.

ATENTAMENTE
Morelia, Michoacán, a 28 de mayo de 2019

MIEMBROS DE LA COMISIÓN REVISORA


Dra. Ma. Blanca Nieves Lara Chávez
Directora de Tesis


Dra. Martha Elena Pedraza Santos


Dr. Héctor Guillén Andrade


Dr. Ignacio Eduardo Maldonado Mendoza


Dr. Ricardo Valenzuela Garza

DEDICATORIAS

Dedico el presente trabajo a mi novia Cinthya y Abuelos, que me motivaban a seguir estudiando, para que mi vida fuera más sencilla, a mi familia por creer en mí.

Mi novia:

Srta. Virginia Cinthya Karina Salas Castillo

Quien es mi motivo para seguir adelante en esta vida que con sus valores, amor y fe en Dios me fue guiando para no desviarme del camino, quien me alenta a conseguir todos mis sueños y lograr todas mis metas.

Mis abuelos:

Sr. Rafael Díaz Mora
Sra. Brígida Diego Hernández (†)

Quienes con mucho esfuerzo y dedicación hicieron de mi lo que soy ahora, por sus consejos, su ejemplo de vida y sobre todo por darme la oportunidad de estudiar.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en mis momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizaje.

A mi novia Virginia Cinthya Karina Salas Castillo que fue uno de los pilares más importantes para concluir esta etapa de mi vida, por creer en mí, por ese apoyo incondicional, por alentarme día a día para seguir adelante y superarme, por que saca siempre lo mejor de mí.

A mis abuelos Rafael Díaz Mora y Brígida Diego Hernández (†) por el apoyo moral y económico, por los valores que me han brindado y por darme la oportunidad de tener una excelente educación en el transcurso de mi vida. Sobre todo por ser un ejemplo de vida a seguir.

Le agradezco la confianza, apoyo y tiempo a mi asesora la Dra. Ma. Blanca Nieves Lara Chávez. Por haber compartido conmigo sus conocimientos y sugerencias brindadas para el desarrollo y culminación del presente trabajo y por tomar el papel de madre con sus consejos ante la vida.

A la universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo que a través de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” me brindó la oportunidad de superarme y concluir esta maravillosa etapa de mi vida.

A mis sinodales: Dra. Martha Elena Pedraza Santos, Dr. Héctor Guillén Andrade, Dr. Ignacio Eduardo Maldonado Mendoza y Dr. Ricardo Valenzuela Garza, por su tiempo, revisión y sugerencias para que este trabajo se realizara de la mejor manera.

A mis primos, tíos, amigos, y todas aquellas personas que de alguna forma u otra hicieron que la estancia en la escuela fuese más placentera y posible.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE CONTENIDO	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE CUADROS APÉNDICE	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	vi
SUMMARY	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Hipótesis.....	2
1.2. Objetivos.....	2
1.2.1. Objetivo general.....	2
1.2.2. Objetivos específicos.....	2
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. Importancia del cultivo de arándano a nivel mundial.....	3
2.2. Hongos Fitopatógenos que afectan el cultivo de arándano.....	3
2.3. Enfermedades causadas por hongos del género <i>Fusarium</i>	5
2.3.1. Síntomas ocasionados por el género <i>Fusarium</i> en cultivos.....	6
2.3.2. Características morfológicas de <i>Fusarium</i> spp.....	7
2.4. Técnicas moleculares.....	9
2.4.1. Extracción de ADN.....	10
2.4.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	11
2.4.3. Herramientas filogenéticas para la caracterización del género <i>Fusarium</i>	12
2.5. Patogenicidad del género <i>Fusarium</i>	14
III. MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1. Área de estudio y muestreo.....	16
3.2. Ubicación del área experimental.....	16
3.3. Muestreo del material biológico.....	16
3.4. Elaboración de medios de cultivo.....	16
3.5. Aislamiento del fitopatógeno.....	16
3.5.1. Purificación de cepas.....	17
3.5.2. Cultivos monospóricos y preservación del patógeno.....	17
3.6. Caracterización cultural y morfológica del género <i>Fusarium</i>	17
3.6.1. Características culturales en medio PDA.....	18
3.6.2. Características morfológicas en medio CLA.....	18
3.6.3. Tasa de crecimiento.....	18
3.7. Extracción de ADN.....	18
3.7.1. Cuantificación y análisis de calidad del ADN.....	18
3.7.2. Reacción en cadena de la polimerasa.....	19
3.7.3. Secuenciación.....	19
3.7.4. Análisis filogenético.....	20
3.8. Caracterización patogénica.....	20
3.8.1. Obtención del material vegetativo.....	20
3.8.2. Preparación del inóculo.....	21
3.8.3. Inoculación.....	21
3.9. Análisis de la información.....	21
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22

4.1. Obtener cepas de raíces de arándano (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.) con síntomas de pudrición radicular en la región productora de Michoacán, México (Objetivo 1).....	22
4.2. Caracterizar e identificar morfológica y molecularmente las cepas obtenidas a partir de raíces de arándano (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.) (Objetivo 2).....	24
4.2.1. Características culturales en medio PDA.....	24
4.2.2. Color de la colonia.....	25
4.2.3. Características morfológicas en medio CLA.....	25
4.3. Tasa de crecimiento.....	31
4.4. Caracterización molecular.....	32
4.4.1. Reacción en cadena de la polimeras.....	33
4.4.2. Análisis filogenético.....	34
4.5. Caracterización patogénica.....	51
V. CONCLUSIONES	58
VI. LITERATURA CITADA	59
VII. APÉNDICE	71

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Primers usados para la identificación de cepas de <i>Fusarium</i> spp., de plantas de arándano.....	19
2	Características orográficas del sitios de recolección de 23 cepas de <i>Fusarium</i> spp., aisladas de plantas de arándano.....	23
3	Concentración de conidios, virulencia y severidad de la enfermedad de 23 cepas de <i>Fusarium</i> spp.....	52

ÍNDICE CUADROS APÉNDICE

Cuadro		Página
2	Comparación de secuencias de ADN en homología con secuencias de base de datos del banco de genes (NCBI GenBank) mediante software BLAST-N.....	71
2	Características morfológicas y culturales de cepas del género <i>Fusarium</i> spp., obtenidas de plantas de arándano con síntomas de pudrición de raíz.....	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Pasos básicos de PCR.....	12
2	Síntomas en follaje.....	23
3	Estrías y círculos observados en <i>Fusarium</i> spp.....	25
4	Características culturales de cepas de <i>Fusarium</i> spp., en medio PDA y estructuras, obtenidas de plantas de arándano.....	28
5	Gel de agarosa 1 % para visualizar DNA genómico extraído de cepas de <i>Fusarium</i> spp, obtenidas de raíz de arándano con síntomas de pudrición.....	33
6	Electorforesis en gel de agarosa al 2 % y tinción con bromuro de etidio para visualizar los amplicones.....	34
7	Árbol de distancia derivado de secuencias parciales del genero <i>Fusarium</i> codificantes para ITS1 y 4 (rDNA), con el método Máxima parsimonia y el modelo de sustitución Jukes-Cantor (JC) con 1000 repeticiones en bootstrap y 514 caracteres. El árbol inicial para la búsqueda heurística se obtuvo automáticamente aplicando algoritmos neighbor-join (NJ).....	36
8	Árbol de distancia derivado de secuencias parciales del genero <i>Fusarium</i> codificantes para ITS1 y 4 (rDNA), con el método Máxima verosimilitud y el modelo de sustitución Jukes-Cantor (JC) con 1000 repeticiones en bootstrap y 514 caracteres. El árbol inicial para la búsqueda heurística se obtuvo automáticamente aplicando algoritmos neighbor-join (NJ).....	37
9	Árbol de distancia derivado de secuencias parciales de H3 obtenidas de las cepas del género <i>Fusarium</i> , se construyó con el método Maxima Verosimilitud y el modelo de sustitución Tamura-Nei con distribución gamma (TN93+G) con 1000 repeticiones en sbootstrap y 445 caracteres. El árbol inicial para la búsqueda heurística se obtuvo automáticamente aplicando algoritmos neighbor-join (NJ).....	39
10	Árbol de distancia derivado de secuencias parciales de H3 obtenidas de cepas del género <i>Fusarium</i> , se construyó con el método Maxima Parsimonia y el modelo de sustitución Tamura-Nei con distribución gamma (TN93+G) con 1000 repeticiones en sbootstrap y 445 caracteres. El árbol inicial para la búsqueda heurística se obtuvo automáticamente aplicando algoritmos neighbor-join (NJ).....	40
11	Árbol de distancia derivado de secuencias parciales de CaM obtenidas de cepas del género <i>Fusarium</i> , se construyó con el método Maxima Verosimilitud y el modelo de sustitución Kimura 2-parametros con distribución gamma (K2+G) con 1000 repeticiones en sbootstrap y 412 caracteres. El árbol inicial para la búsqueda heurística se obtuvo automáticamente aplicando algoritmos neighbor-join (NJ).....	42
12	Árbol de distancia derivado de secuencias parciales de CaM obtenidas de cepas del género <i>Fusarium</i> , se construyó con el método Maxima parsimonia y el modelo de sustitución Kimura 2-parametros con distribución gamma (K2+G) con 1000 repeticiones en sbootstrap y 412 caracteres. El árbol inicial para la búsqueda heurística se obtuvo automáticamente aplicando algoritmos neighbor-join (NJ).....	43

13	Árbol de distancia derivado de secuencias parciales del genero <i>Fusarium</i> codificantes para EF-1 α , se construyó con el método Máxima Verosimilitud y el modelo de sustitución Tamura-Nei con distribución gamma (TN93+G) con 1000 repeticiones en bootstrap y 676 caracteres. El árbol inicial para la búsqueda heurística se obtuvo automáticamente aplicando algoritmos neighbor-join (NJ).	45
14	Árbol de distancia derivado de secuencias parciales del genero <i>Fusarium</i> codificantes para EF-1 α se construyó con el método Máxima Parsimonia y el modelo de sustitución Tamura-Nei con distribución gamma (TN93+G) con 1000 repeticiones en bootstrap y 676 caracteres. El árbol inicial para la búsqueda heurística se obtuvo automáticamente aplicando algoritmos neighbor-join (NJ).....	46
15	Árbol de distancia derivado de la combinación de secuencias parciales de los genes ITS1 y 4 (rDNA), H3, CaM y EF-1 α , obtenidas de cepas del genero <i>Fusarium</i> , se construyó con el método Máxima Verosimilitud y el modelo de sustitución General Time Reversible con distribución gamma (GTR+G) con 1000 repeticiones en bootstrap y 2047 caracteres. El árbol inicial para la búsqueda heurística se obtuvo automáticamente aplicando algoritmos neighbor-join (NJ).....	48
16	Árbol de distancia derivado de la combinación de secuencias parciales de los genes ITS1 y 4 (rDNA), H3, CaM y EF-1 α , obtenidas de cepas del genero <i>Fusarium</i> se construyó con el método Máxima Parsimonia y el modelo de sustitución General Time Reversible con distribución gamma (GTR+G) con 1000 repeticiones en bootstrap y 2047 caracteres. El árbol inicial para la búsqueda heurística se obtuvo automáticamente aplicando algoritmos neighbor-join (NJ).....	49
17	Síntomas iniciales observados en plantas de arándano.....	53
18	Severidad y virulencia de 23 cepas de <i>Fusarium</i> spp., inoculadas en plantas de arándano.....	54
19	Síntomas muerte.....	55
20	Síntomas que presentaron grado III en la escala de Lara (2008).....	55
21	Grado III en la escala de Lara (2008).....	56
22	grado I en la escala de Lara (2008).....	56
23	Porcentaje de cepas por cada grado de severidad de la enfermedad grado de severidad en la escala Lara (2008) aisladas de raíz de arándano.....	57

RESUMEN

En el presente estudio se planteó el objetivo de determinar la presencia, caracterizar morfológica, molecular y patogénicamente *Fusarium* spp., asociados a raíz de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) en la región productora de Michoacán, México. La recolección de plantas enfermas de arándano se llevó a cabo en siete municipios, en ocho comunidades (cinco huertos por comunidad). Se obtuvieron 23 cepas. La caracterización morfológica se realizó con base a sus características culturales en el medio nutritivo PDA y tasa de crecimiento, y las microscópicas presencia y ausencia de macroconidios, microconidios, clamidosporas e hifas enrolladas en medio de cultivo CLA. Molecularmente se caracterizó mediante la extracción de ADN de las cepas, posteriormente se amplificó un fragmento del ADN extraído, con base a los iniciadores que codifican para la región ITS1 y 4 (rDNA), CaM, H3 y EF-1 α . La patogenicidad de las cepas se evaluó para determinar la interacción fitopatógeno hospedero, mediante pruebas realizadas en plantas de arándano obtenidas a partir de propagación *in vitro* para asegurar su sanidad, se inocularon cinco plantas por cepa con una solución de conidios. Se evaluó la virulencia y la severidad por los daños presentados en el follaje. El análisis morfológico indicó que las 23 cepas pertenecen al género *Fusarium*. Con las secuencias de ADN amplificadas por los genes ITS1 y 4 (rDNA), CaM, H3 y EF-1 α se identificaron 13 cepas que pertenecen a *Fusarium oxysporum* Schl, corresponden a las cepas LRE1, ZIH21, ZIR12, ZIR13, LRE2, SAN8, TAC16, SAN9, TAC15, ZIH22, ZIR14, ZIH23 y SAN7, de estas las cepas LRE1, ZIH21, ZIR12, ZIR13 con *F. oxysporum* f. sp *fragariae* y SAN9 con *F. oxysporum* f. sp *opuntiarum*. Las 10 cepas restantes con *Fusarium Sublutinans* (ZIR19, TAN5, TAN6, LRE3, ZAM11, ZAM10, TIR17, ZIH20, TAN4 y TIR18). El total de las cepas fue capaz de producir síntomas en las plantas de arándano; necrosis apical, enrollamiento de bordes de hojas, amarillamiento y muerte de ramas.

Palabras clave: Morfología, biología molecular, genes, análisis filogénico, patogenicidad.

SUMMARY

In the present investigation the aim was to determine the presence, characterize morphological, molecular and pathogenically *Fusarium* spp., associated to the rot of cranberry (*Vaccinium corymbosum* L.) in the producing region of Michoacán, México. The collection of diseased plants was made in seven municipalities, in eight communities (five orchards for community). 23 strains were obtained. The morphological characterization was made by its cultural characteristics in PDA nutrient medium and growth rate, and the microscopic presence and absence of macroconidia, microconidia, clamidospores and rolled hyphae in CLA nutrient medium. Molecularly it was characterized by DNA extraction of the strains, later a fragment of the extracted DNA was amplified, based on the initiators that codifies for the region ITS1 and 4 (rDNA), CaM, H3 and EF-1a. The pathogenicity of the strains was evaluated to determinate the interaction phytopathogen host, by tests made in plants of cranberry obtained from in vitro propagation to assure its health, five plants by strain were inoculated with a solution of conidia. The virulence and severity of the damage presented in the foliage was evaluated. The morphological analysis indicated that the 23 strains belong to the gender *Fusarium*. With the amplified sequences of DNA by the gens ITS1 and 4 (rDNA), CaM, H3 and EF-1a 13 strains that belongs to *Fusarium oxysporum* Schl, were identified which correspond to the strains LRE1, ZIH21, ZIR12, ZIR13, LRE2, SAN8, TAC16, SAN9, TAC15, ZIH22, ZIR14, ZIH23 and SAN7, of this the strains LRE1, ZIH21, ZIR12, ZIR13 with *F. oxysporum* f. sp *fragariae* and SAN9 with *F. oxysporum* f. sp *opuntiarum*. The remaining 10 strains with *Fusarium Sublutinans* (ZIR19, TAN5, TAN6, LRE3, ZAM11, ZAM10, TIR17, ZIH20, TAN4 y TIR18). The total of the strains was able to produce symptoms on the cranberry plants; apical necrosis, leaf edge curl, yellowing and death of branches.

Key words: morphology, molecular biology, gens and phylogenetic analysis.

I INTRODUCCIÓN

El género *Fusarium*, también conocido por sus teleomorfos *Nectria* y *Gibberella* es uno de los géneros más ampliamente distribuidos del reino de los hongos, comprende un gran diversidad morfológica y filogenética, (Michielse y Martijn, 2009; Leslie y Summerell 2006; Aoki *et al.*, 2014). Muchas especies de *Fusarium* son fitopatógenos de plantas, pero también pueden actuar como parásitos secundarios, oportunistas, invasores y numerosas especies son importantes productores de micotoxinas que pueden contaminar los alimentos, especialmente en semillas almacenadas (Bhat *et al.*, 2009).

Las especies del género *Fusarium* son reconocidas por presentar alta diversidad morfológica, debido a esto se han estandarizado métodos junto con datos moleculares multi-locus, que actualmente son requeridos para una identificación segura a nivel de especie (Torbatí *et al.*, 2018; O'Donnell *et al.*, 2009). Los rasgos morfológicos útiles incluyen las características generales de la colonia (forma, color y presencia de pigmentos difusibles), forma y desarrollo de las clamidosporas, presencia o ausencia de esporodoquio, y tipo de macro y microconidios (Leslie y Summerell 2006; Torbatí *et al.*, 2018). *Fusarium* posee diversidad de caracteres que pueden ser usados para separarlo de otros géneros; pero las diferencias entre especies pueden resultar complicadas, aunque muchos conceptos morfológicos han cambiado, otros han permanecido estables aun cuando son confrontados con criterios genéticos y moleculares (Leslie y Summerell, 2006).

Análisis filogenéticos comparativos han revelado que el genoma de *Fusarium* está dividido en regiones responsables del metabolismo primario y la reproducción (genoma central); y la virulencia, especialización del huésped y posiblemente otras funciones (genoma adaptativo). Los genes implicados en la virulencia y la especialización del hospedero se encuentran en los cromosomas de patogenicidad dentro de cepas fitopatógenas, por ejemplo para el tomate (*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*) y el chícharo (*Fusarium solani* f. sp. *pisi*). La transferencia experimental de cromosomas de patogenicidad de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* en un no fitopatógeno transformó este último en un fitopatógeno de tomate, por lo tanto, la transferencia horizontal puede explicar los orígenes polifiléticos de la especificidad del huésped dentro del género, (Li-Jun *et al.*, 2013).

A la fecha no se tienen reportes de que el cultivo de arándano sea hospedero de especies del género *Fusarium*, sin embargo en plantaciones se han reportados pudriciones radiculares debido a esto y a la importancia que el arándano ha tenido en México, se hace necesario

conocer las principales enfermedades que lo afectan. En Michoacán el cultivo está distribuido en diferentes áreas agroecológicas (Gutiérrez-Contreras *et al.*, 2010), esto hace que este influenciado por diversos factores que limitan su producción y afectan su calidad, uno de ellos son las enfermedades de la raíz de tipo fungoso, sin embargo hasta ahora no se cuenta con información sobre su diversidad fenotípica y patogénica de su agente causal, información que permitirá la implementación de un manejo orientado a desarrollar variedades resistentes y productivas adaptadas a las condiciones de Michoacán, que contribuyan a un manejo eficaz de la enfermedad. Por lo anterior en el siguiente trabajo de investigación se planteó la siguiente hipótesis y objetivos:

HIPÓTESIS

Fusarium spp., se encuentra asociado al síntoma de marchitez arándano (*Vaccinium corymbosum* L.).

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar las especies de *Fusarium* spp., aisladas de raíz de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) en la región productora de Michoacán, mediante su caracterización morfológica y molecular para analizar su patogenicidad

Objetivos específicos:

1. Obtener cepas de hongos de raíces de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) con síntomas de pudrición radicular.
2. Caracterizar e identificar morfológica y molecularmente las cepas obtenidas a partir de raíces de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.).
3. Determinar la virulencia y severidad de las cepas caracterizadas e identificadas, inoculadas en plantas de arándano.

II REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Importancia del cultivo del arándano a nivel mundial

El arándano ha tenido una rápida aceptación por parte de los consumidores de todo el mundo por su tamaño, facilidad de cocción y una larga vida de anaquel, estas cualidades además de su sabor único han sido los detonantes para el desarrollo de su producción industrial. Esta baya tiene importancia cultural en Norte América, quienes han generado variedades y prácticas de cultivo en zonas específicas para reducir las enfermedades, los ataques de insectos y disminuir el estrés de algunas variedades provocado por temperaturas extremas, inundaciones y heladas. Por esto, Estados Unidos de Norte América es el principal productor, consumidor, exportador e importador de arándanos del mundo y junto a Canadá abarcan 90 % del área productiva total (Victoriano, 2010) seguidos de México, Polonia, Alemania y Francia (FAOSTAT, 2016).

Entre el 2000 y el 2010, el área cultivada de arándanos aumentó globalmente en un 275 %, e incluyó tanto áreas tradicionales como no tradicionales de cultivo (Bañados, 2006; Finn *et al.*, 2014). En América Latina, en Chile, Argentina, Uruguay y México se ha experimentado un fuerte auge en la producción de arándanos (Bañados, 2006).

2.2 Hongos fitopatógenos que afectan el cultivo del arándano

En el ciclo productivo del arándano, éste es afectado por distintos fitopatógenos que disminuyen el rendimiento final de su producción o calidad del fruto. Las condiciones y el manejo del cultivo son factores que favorecen la incidencia de fitopatógenos. Uno de los patógenos más importante que afecta a este cultivo son; *Phytophthora cinnamomi*, hongo que produce pudrición de la raíz, y la cual es favorecida por el exceso de agua y temperaturas altas en el suelo. La enfermedad puede comenzar desde el vivero, donde se produce la muerte de brotes, la necrosis de la base del tallo y una falta de desarrollo radical. En los huertos, los síntomas son clorosis y necrosis del borde de las hojas, follaje rojizo, defoliación, menor crecimiento y falta de vigor. Las plantas enfermas tienen mayor aborto floral, producen fruta más pequeña y ácida. El sistema radical muestra necrosis parcial o total de raíces secundarias que pueden progresar hasta dejarlas completamente negras, la corteza de la raíz se desprende con facilidad, exhibiendo un centro de tonalidades café oscura. Actualmente no hay una variedad resistente a este agente causal.

El moho gris (*Botrytis cinérea*) cuando está presente en las flores las destruye, en periodos de lluvia o días nublados que ocurren en la etapa de floración. Se caracteriza por una pudrición húmeda, de color marrón que en condiciones de alta humedad se cubre con esporas de color grises con aspecto algodonoso.

Botryosphaeria dothidea o mildiu del tallo, muestra decoloración al interior y tejido necrótico, las hojas se tornan cloróticas y eventualmente hay senescencia de manera decedente en la planta hasta que paulatinamente muere (Williamson y Lyrene, 2004).

Pucciniastrum vaccinii produce la roya del arándano, los síntomas son hojas amarillas al inicio y si la enfermedad es severa, la hoja muere eventualmente al tornarse necrótica, las hojas infectadas caen prematuramente y una defoliación severa reduce la siguiente producción de fruta (Caruso y Ramsdell, 2007).

Armillaria mellea o armilariosis, este hongo causa que las plantas sufren un lento decaimiento junto con clorosis o follaje rojizo de algunas o todas las ramas. El cuello de las plantas se torna de un aspecto corchoso, la corteza se desprende con facilidad y bajo ésta se observa abundante micelio, de color blanco y dispuesto en forma de abanicos, también puede ser visible hacia el interior de la corona. En las raíces primarias se producen rizomorfos de color negro, los que corresponden a micelio entrelazado hasta formar estructuras tipo cordones que son utilizadas por el hongo para colonizar plantas nuevas. Los síntomas se hacen más evidentes en verano cuando ocurre la muerte repentina de ramas o toda la planta.

Verticillium dhaliae, produce marchitez y clorosis moderada del follaje, seguido de un rápido desecamiento del borde de las hojas durante el verano; similar a la falta de agua. Esta marchitez o necrosis de hojas puede ser parcial dentro de las ramas o dentro del arbusto. La mayor intensidad de síntomas se produce en verano y se caracteriza por obstruir el sistema vascular (xilema) impidiendo el paso de agua y nutrientes hacia el follaje, lo que induce la marchitez. Al cortar los tallos afectados se observan anillos necróticos que pueden ser parciales o completos. También, ocurre pudrición de raíces y desarrollo de un micelio plumoso alrededor del cuello y raíces primarias de las plantas enfermas.

La muerte regresiva es causada por *Phomopsis vaccinii*, (*Diaporthe vaccinii*) en las ramas terminales hasta llegar a la base de la rama de la temporada anterior produciendo una coloración negra brillante. También, desarrolla canchales superficiales y lisos, sobre los cuales se pueden formar picnidios que están inmersos en la corteza; los picnidios son estructuras

huecas con forma de pera en cuyo interior se producen los conidios, pero que se observan como pequeños puntos negros en la superficie de la rama enferma. La muerte de ramas afecta la producción de la próxima temporada.

La ntracnosis del fruto ocasionada por *Colletotrichum acutatum*, muestra síntomas los cuales se observan principalmente en postcosecha, apareciendo pequeños acérvulos de color anaranjado en la epidermis de la fruta. Bajo condiciones de alta humedad relativa, el hongo aumenta la producción de conidios. A medida que se desarrolla el hongo se produce la deshidratación del fruto y este termina momificado y cubierto por los conidios del patógeno. Este organismo también puede afectar las flores, pero su daño pasa inadvertido. Si bien la infección parte desde la floración, la mayor expresión de síntomas se observa en postcosecha. (Cisternas y France, 2009).

La muerte de esquejes y el atizonamiento de tallos son síntomas ocasionado por *Fusarium* spp. Las especies de este género de hongo reducen su crecimiento, causan marchitamiento, muerte de la planta y un escaso desarrollo de raíces (Wright y Cotta, 1996).

2.3 Enfermedades causadas por hongos del género *Fusarium*

Las enfermedades en las plantas ocasionadas por especies de *Fusarium* en los trópicos han tomado gran importancia con los sistemas de producción de alto rendimiento y cultivares genéticamente uniformes (Salleh, 1994).

Comúnmente asociado a la inducción de enfermedades en muchas plantas de importancia económica ya sean ornamentales o de cualquier otro cultivo, el género *Fusarium* ocasiona pudriciones en coronas, yemas y raíces (Noda *et al.*, 1991; Raabe *et al.*, 1981; Barile y Esguerra, 1984; Paull *et al.*, 1988; Leslie y Summerell, 2006; Kraft *et al.*, 1981; Linderman, 1981; Nelson *et al.*, 1981). Los síntomas que presentan las plantas afectadas generalmente son un crecimiento anormal manifestado en la disminución de su porte, vigor y producción (Ploetz, 2007). Las enfermedades vasculares reducen la capacidad de translocación de agua y nutrientes en la planta en más del 95 % lo que ocasiona marchitez en un inicio y eventualmente su muerte, (Agrios, 2005).

La diseminación del fitopatógeno ocurre a través de la siembra de materiales vegetales infectados, movimiento de suelo, hojas contaminadas y raíces que crecen alrededor de plantas enfermas, aunque el viento y el agua de escorrentía o riego son los principales diseminadores entre áreas cercanas. El hongo sobrevive en su fase saprofita en el suelo por

tiempo indefinido favorecido por alta humedad y lluvias frecuentes (Agrios 2005; Ploetz, 2007).

2.3.1 Síntomas ocasionados por el género *Fusarium* en cultivos

Las especies del género *Fusarium* se encuentran entre los fitopatógenos más importantes para la agricultura porque están ampliamente distribuidos en el suelo y sustratos orgánicos, generalmente en suelos localizados en regiones templadas y tropicales (Booth, 1986). Algunas especies de este género producen micotoxinas en alimentos almacenados y causan enfermedades a animales y al hombre, entre las especies involucradas se destacan: *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. verticillioides*, *F. moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. chlamydiosporum*, *F. dimerum* y *F. antophilum*. (Ortoneda *et al.*, 2003; Rabodonirina *et al.*, 1994). El género *Fusarium* está ampliamente dotado con formas de sobrevivencia y uno de los mecanismos que posee es la capacidad de cambio rápido tanto de hospedero como de su morfología y comportamiento (Booth, 1986; Alves-Santos *et al.*, 2002; Katan y Di Primo, 1999; Ortoneda *et al.*, 2003).

Uno de los cultivos que ataca este género es *Gladiolus grandiflorus*, la sintomatología en este cultivo ornamental es un marchitamiento conocido como fusariosis. De acuerdo con la parte afectada se pueden distinguir síntomas como: pudrición de cormo, amarillamiento y marchitez del follaje y por último, obscurecimiento y muerte de raíces. Las plantas infectadas pierden su vigor y la floración es tardía, producen tallos de color verde oscuro, las flores son más pequeñas y se desarrollan a un solo lado de la espiga, hojas angostas, frecuentemente amarillas y curvadas, el cuello de la planta se torna putrescente, lo que ocasiona que las hojas se separen del cormo (Olalde *et al.*, 2017). Los cormos infectados presentan manchas hundidas de color café, en el suelo la pudrición tiene apariencia suave, pero después de su cosecha, los tejidos se secan durante el almacenamiento y se momifican, los cortes del cormo enfermo muestran frecuentemente un color oscuro, las condiciones favorables para que se desarrollen estos síntomas son una temperatura de 18 a 25 °C y una humedad relativa alta (Bailey, 1998).

En *Solanum esculentum* el *Fusarium* reduce el crecimiento en la planta, posteriormente las plantas se marchitan y eventualmente mueren, los principales síntomas visibles en la planta son una ligera decoloración en las nervaduras de los folíolos jóvenes, seguido de la epinastia de las hojas senescentes. Por lo general, estos síntomas aparecen solo en uno de los lados del

tallo y avanzan de manera ascendente hasta destruir el follaje, ocasionan la muerte de la planta, los síntomas son similares a los que causa el estrés hídrico (Agrios, 2005).

En *Allium sativum* ocasiona la pudrición basal, este fitopatógeno afecta al ajo desde que se encuentra en plántula (Quiroz *et al.*, 2008; Velásquez y Medina, 2004). El ataque de *Fusarium* sp en *Triticum aestivum* causa reducción en el rendimiento del cultivo, pero además afecta la calidad del grano. En ataques tempranos puede provocar aborto de granos, limitando el número total que producirá la espiga o bien cuando el grano está formado limita su desarrollo, quedando arrugados y en consecuencia muy livianos, con bajo peso. En el cultivo se pueden observar espiguillas y espigas de color blanquecinas en contraste con las no afectadas de color verde. El tegumento adquiere un color blanquecino, puede tener zonas color rosado y el endospermo presentar un aspecto duro de color blanco intenso (Cuniberti, 2001).

2.3.2 Características morfológicas de *Fusarium* spp.

El género *Fusarium* posee un gran número de caracteres que pueden ser usados para diferenciarlo de otros géneros, sin embargo, entre especies puede resultar complicado, aunque muchos conceptos morfológicos de las especies han cambiado, otros han permanecido estables aun cuando son desafiados con criterios genéticos y moleculares (Leslie y Summerell, 2006).

En medio de cultivo el género *Fusarium* presenta un patrón de crecimiento radial en sus colonias, extenso y algodonoso, incoloro en un principio conforme madura se torna de coloración blanco, crema, amarillo, rosa hasta púrpura, su micelio es aéreo, septado. Típicamente este hongo produce a partir de fialosporas (fiálides) dos tipos de conidios denominados, macroconidios y microconidios debido a sus respectivos tamaños, los macroconidios son largos y curvados, multiseptados en forma de canoa y se originan de conidióforos dispuestos en esporodoquios, aunque también se pueden originar en conidióforos separados, este es el carácter morfológico más importante para la identificación de especies. Los microconidios no son producidos por todas las especies de *Fusarium* por lo que su sola presencia es un carácter taxonómico importante, generalmente son unicelulares y en forma ovalada, piriforme, fusiforme o esferoidal. En ocasiones los hay de apariencia intermedia (Summerell *et al.*, 2003; Leslie y Summerell, 2006).

La presencia de clamidosporas es un carácter importante en la descripción de varias especies de *Fusarium*. Estas pueden ser sencillas, dobles, en masas y en cadenas, pueden encontrarse en el micelio aéreo o embebidas en el agar, con frecuencia su localización es importante para la identificación de las especies (Leslie y Summerell, 2006).

Micelio

Con un patrón de crecimiento radial en sus colonias, extenso y algodonoso, aéreo, septado, hialino al principio, conforme madura adquiere un color blanco, crema, amarillo, rosa y hasta púrpura (Leslie y Summerell, 2006).

Macroconidios

Es el carácter morfológico más importante para la identificación de especies del género *Fusarium*. En algunos casos la morfología de los macroconidios es suficiente para la identificación del aislamiento. Se recomienda el uso del medio (Carnation Leaf-piece Agar) CLA para su observación. El primer carácter observable es el tamaño, que en la mayoría de los casos es relativamente constante y las variaciones en su longitud pueden significar que hay problemas con el medio de cultivo utilizado, o puede ser una especie diferente. El número de septos presentes se ve determinado por el rango de su tamaño, pueden ser de tres tipos. En el primer tipo son rectos, la mayoría son delgados, semejantes a una aguja. En el segundo tipo presentan una curvatura a todo lo largo o sólo en una porción de la espora. En el tercer tipo presentan el lado dorsal más curvado que el lado ventral, en estos macroconidios las células centrales usualmente son más anchas que las células terminales, los extremos con frecuencia son importantes para la determinación morfológica. La forma de la célula apical y la del pie puede usarse para delimitar especies. Existen cuatro formas de células apicales: forma obtusa, papilado, gancho y como huso. La célula basal o pie también tiene cuatro formas: en forma de pie, pie largo, muesca y muesca ligera (Leslie y Summerell, 2006; Toussonun, y Nelson, 1975).

Microconidios

Los microconidios no son producidos por todas las especies del género *Fusarium*, por lo que su sola presencia es un carácter importante. El tamaño, forma y número de septos de los microconidios, las células conidióforas en las cuales nacen y su arreglo en los conidióforos son caracteres importantes y potenciales para un diagnóstico. El número de septos usualmente es cero o uno, pero algunas especies pueden producir conidios con dos septos.

Las formas más comunes son: reniforme, ovalada, piriforme, napiforme, globoso, esférico y fusiforme (Leslie y Summerell, 2006).

Clamidosporas

La presencia de clamidosporas es un carácter importante en la descripción de varias especies del género *Fusarium*. Las clamidosporas pueden ser sencillas, dobles, en masas y en cadenas. Se les puede encontrar en mayor cantidad en medio CLA que en SNA (medio de cultivo Spezieller Nährstoffarmer) después de seis semanas de incubación. Las clamidosporas pueden encontrarse en el micelio aéreo o embebidas en el agar, con frecuencia su localización es importante para la identificación de las especies (Leslie y Summerell, 2006).

Otros caracteres

Existen otros caracteres que pueden ser usados para la delimitación de especies que no son observados en todas las especies. Las hifas enrolladas son importantes para algunas especies, particularmente *F. circinatum* y *F. sterilihyphosum*. Algunas especies producen cristales en el medio nutritivo PDA (Leslie y Summerell, 2006). El teleomorfo (estado sexual) puede ser un carácter definitivo en definir especies, normalmente estos estados sexuales se observan bajo condiciones controladas de laboratorio más que en el campo y aunque su morfología no es por lo general suficientemente diferente para ser usado como un marcador para la identificación, su formación puede ser muy importante (Leslie y Summerell, 2006; Toussonun y Nelson, 1975).

2.4 Técnicas moleculares

Tradicionalmente las especies de los hongos han sido identificadas por técnicas morfológicas, sin embargo, la identificación basada en la comparación de caracteres morfológicos a menudo es complicada y tardada ya que se aplican la observación y el reconocimiento de las características de los aislados (Watanabe *et al.*, 2011). Técnicas de diagnóstico alternativas, como las herramientas moleculares, han sido desarrolladas en las últimas décadas, protocolos basados en PCR e iniciadores específicos proporcionan un diagnóstico con mejor fundamento y permiten identificaciones taxonómicas a nivel especie (Edwards *et al.*, 2002).

En la actualidad, el estudio de la variación genética entre individuos, poblaciones y especies para explicar patrones y procesos ecológico-evolutivos se aborda mediante marcadores

moleculares, segmentos de ADN con o sin función conocida que proporcionan información sobre la variación alélica y permiten distinguir individuos (Schlotterer, 2004). Los datos moleculares han permitido estudiar con mayor precisión los patrones de diversidad genética y su distribución, el comportamiento, la selección natural, las interacciones biológicas, la composición, funcionamiento y dinámica de comunidades microbianas, las relaciones filogenéticas, entre otros (Sunnucks, 2000; Schlotterer, 2004; Hudson, 2008). La aplicación de técnicas moleculares inicia con la extracción de ADN y la obtención exitosa de datos confiables y reproducibles depende en gran medida de la extracción de ADN íntegro y puro.

2.4.1 Extracción de ADN

La extracción consiste en el aislamiento y purificación de moléculas de ADN y se basa en las características fisicoquímicas de la molécula. El ADN está constituido por dos cadenas de nucleótidos unidas entre sí, formando una doble hélice. Los nucleótidos están integrados por un azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada. La unión de los nucleótidos ocurre entre el grupo fosfato y el azúcar, mediante enlaces fosfodiéster, dando lugar al esqueleto de la molécula. Las bases de cadenas opuestas se unen mediante puentes de hidrogeno y mantienen estable la estructura helicoidal. Los grupos fosfato están cargados negativamente y son polares, lo que le confiere al ADN una carga neta negativa y lo hace altamente polar, características que son aprovechadas para su extracción. Los grupos fosfato tienen una fuerte tendencia a repelerse, debido a su carga negativa, lo que permite disolver al ADN en soluciones acuosas y formar una capa hidratante alrededor de la molécula. Pero, en presencia de etanol se rompe la capa hidratante y quedan expuestos los grupos fosfato. Bajo estas condiciones se favorece la unión con cationes como Na^+ que reducen las fuerzas repulsivas entre las cadenas de nucleótidos y permiten que el ADN precipite (Sambrook *et al.*, 1989). Por otro lado, la carga neta negativa del ADN le permite unirse a moléculas y matrices inorgánicas cargadas positivamente (Nason, 1965; Travaglini 1973; Sambrook *et al.*, 1989; Sinden, 1994). A través del tiempo se han diseñado distintos protocolos con la finalidad de obtener una cantidad y calidad de ADN adecuados, así como garantizar la eliminación de inhibidores potenciales que dificulten el tratamiento posterior de la molécula. Los métodos tradicionales, desarrollados en los años 50, utilizan solventes orgánicos para separar a las proteínas del ADN y, una vez suspendido en la fase acuosa, aislarlo por precipitación con etanol. Estos métodos requieren preparar soluciones y la extracción puede tomar desde unas horas hasta varios días por los numerosos pasos que deben realizarse.

2.4.2 Reacción en cadena polimerasa (PCR)

La gran complejidad de los procesos biológicos en los seres vivos ha sido por años la razón por la que los investigadores han centrado su atención en descifrar los mecanismos que se esconden detrás de esos procesos. Desde el descubrimiento de la estructura de ADN, se ha mostrado un gran interés por desarrollar métodos sensibles y reproducibles que permitan estudiar los ácidos nucleicos. Es así como han aparecido diferentes tecnologías cuyos protocolos están dirigidos a esto; probablemente, la más importante sea la reacción en cadena de la polimerasa que revolucionó la biología molecular y la forma en cómo se estudiaban los ácidos nucleicos (Mullis, 1990).

La “Reacción en Cadena de la Polimerasa” (PCR) fue descrita en 1972 y 1974 por el grupo de Khorana aunque pasó sorpresivamente desapercibida durante años. Su reinención por Kary B. Mullis ha representado una de las mayores revoluciones en las ciencias de la vida. Finalmente, la técnica fue automatizada y popularizada en 1988 mediante el empleo de una ADN polimerasa termoestable (Saiki *et al.*, 1998). La PCR se basa en la amplificación selectiva y exponencial de una región del ADN molde. Esta reacción es catalizada por una enzima ADN polimerasa termoestable, en presencia de dos oligonucleótidos (18-30 nucleótidos) denominados iniciadores o primers diseñados para que se unan a los extremos de la región a amplificar. Los iniciadores hibridan con el ADN desnaturalizado en dos zonas del mismo, creando así dos fragmentos de ADN de doble cadena que ceban a la ADN polimerasa y delimitan la región que se amplifica. De esta manera la ADN polimerasa duplica un fragmento de ADN, y repitiendo el ciclo varias veces se consigue una multiplicación exponencial del fragmento, que permite obtener una cantidad de ADN visible a partir de una sola molécula del mismo (Ward, 1994). Partiendo de este principio, la reacción en cadena polimerasa se basa en la repetición de un ciclo formado por tres etapas:

1. desnaturalización, aquí la doble hélice del ADN se separa en dos hebras, para ello se realiza una incubación de la muestra a altas temperaturas (92-96 °C).
2. Hibridación: en esta etapa los cebadores se unen a las zonas complementarias que flanquean el fragmento que queremos amplificar, esto ocurre a una temperatura que va de 50 a 65 °C.
3. La extensión: en ella se produce la síntesis de una cadena sencilla y por complementariedad se produce un fragmento de doble cadena en dirección 5'>3' mediante la enzima DNA polimerasa, la cual incorpora los dNTP's presentes en el medio siguiendo la cadena molde, (Figura1). Estas etapas constituyen un ciclo y esto se repite por lo menos 30 ciclos lo cual genera inicialmente en el primer ciclo 2 moléculas, en el segundo 4, en el

tercero 8 y así progresivamente hasta en el ciclo 30 obtener de millones de moléculas de fragmento amplificado.

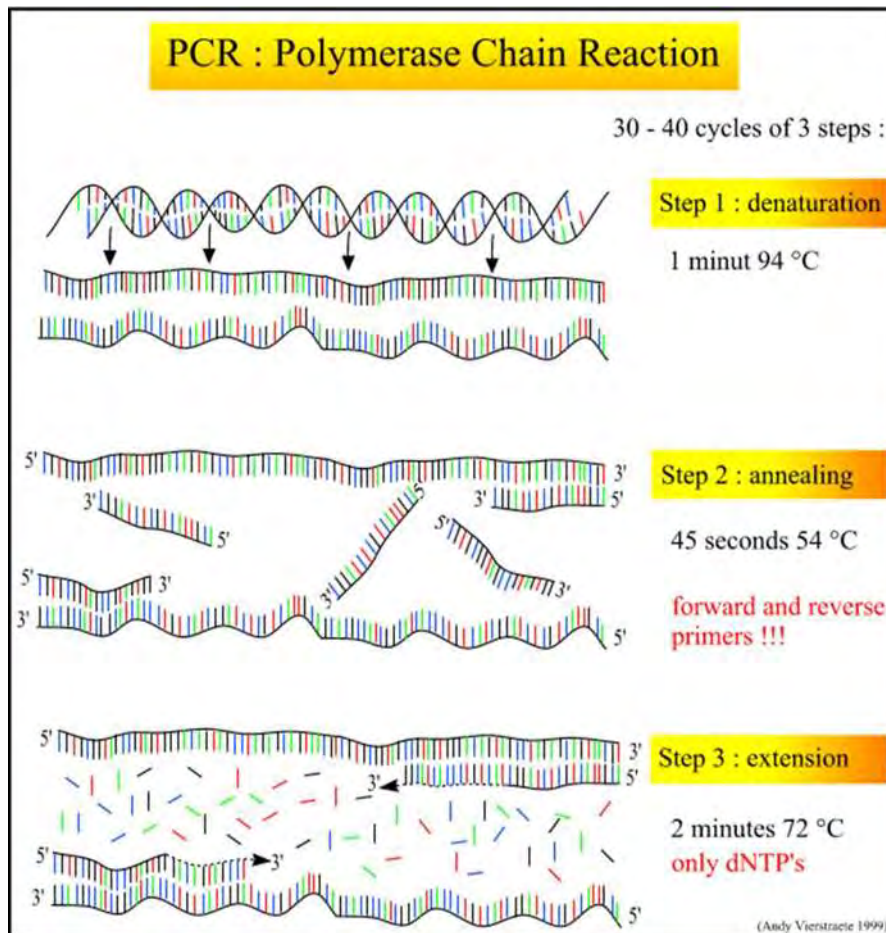


Figura 1: Pasos básicos de la PCR (Andy, 1999).

2.4.3 Herramientas biotecnológicas para la caracterización del género *Fusarium*

El sistema taxonómico del género *Fusarium* se ha basado en las característica morfológicas de macroconidios, microconidios y clamidosporas, así como metabolitos secundarios (Thrane, 2001). Estas características morfológicas son clave para la taxonomía e identificación de *Fusarium* (Shahnazi *et al.*, 2012). Actualmente las especies de *Fusarium* se identifican principalmente con base a sus características morfológicas, biológicas y filogenéticas. Por lo tanto, resulta un reto acertar el estatus taxonómico de las especies de este género al tomar en cuenta simplemente sus características fenotípicas (Moretti, 2004).

A menudo, son utilizados marcadores moleculares para la caracterización de especies de *Fusarium*, usualmente secuencias de ADN y por lo tanto se dispone de caracteres relevantes,

independientemente del estatus morfológico o fertilidad sexual de la cepa. Sin embargo, en la actualidad se utiliza la información molecular en combinación con caracteres morfológicos distintivos, para identificar grupos que anteriormente fueran descritos como especies separadas (Marasas *et al.*, 2001; Zeller *et al.*, 2003).

Las técnicas basadas en ADN se han convertido en una herramienta por excelencia para la cuantificación y entendimiento de la diversidad genética y de la filogenia de las especies de *Fusarium*. Dicha herramienta ha sido utilizada para descubrir un gran número de especies en complejos como el de *Gibberella fujikuroi* el cual es un linajes monofilético rico en especies con anamorfos en el género *Fusarium* (O'Donnell y Cigelnik, 1997; O'Donnell *et al.*, 1999). Los límites de especie dentro de este complejo han sido objeto de mucho debate durante los últimos treinta años (Boot, 1971; Nirenberg, 1976; Gerlach y Nirenberg, 1982; Nelson *et al.*, 1983), se han estudiado utilizando la morfología (Nirenberg y O'Donnell, 1998; Nirenberg *et al.*, 1998), experimento de apareamiento (Leslie, 1995; Leslie y Summerell, 2006) y análisis filogenéticos de datos de secuencias de ADN (O'Donnell *et al.*, 2000; O'Donnell *et al.*, 1998).

Los estudios moleculares y de sistemática han revelado la perfecta concordancia entre las especies filogenéticas resueltas como poblaciones o linajes dentro de los árboles de genes y las poblaciones de apareamiento o las especies biológicas, lo que indica que estos dos conceptos de especies identifican las mismas unidades taxonómicas fundamentales, (O'Donnell *et al.*, 2000).

Se ha investigado la taxonomía e identificación de especies del género *Fusarium*, con base a varios marcadores genéticos, sin embargo, aún no ha sido posible encontrar un marcador adecuado para la identificación de todas las especies (Watanabe *et al.*, 2011), el alto grado de variabilidad dentro de la especie *F. oxysporum* ha sido asociada con la complejidad de las especies (Baayen *et al.*, 2000).

Varios marcadores moleculares se han utilizado para analizar la diversidad de especies del género *Fusarium* patógenas de plantas a nivel genoma: AFLPs, en *Fusarium graminearum* y *F. asiaticum* (Qu *et al.*, 2008), RAPD e ISSR en *Fusarium graminearum* y *Fusarium culmorum* (Vogelgsang *et al.*, 2008; Mishra *et al.*, 2003).

Se ha intentado caracterizar líneas de *F. oxysporum* por diferentes técnicas, como regiones IGS e ITS, sin embargo esto no ha proporcionado resultados favorecedores (Thangavelu *et*

al., 2012). Los genes del ARN ribosomal se han usado en estudios filogenéticos, sin embargo no se ha estado de acuerdo con ello, porque estos marcadores, no permiten una buena separación filogenética ya que estas regiones presentan tasas de evolución desiguales entre diferentes especies lo que no permite un buen agrupamiento en los árboles filogenéticos. Para disminuir estas críticas, varios genes codificantes de proteínas se han explorado como marcadores filogenéticos (Knutsen *et al.*, 2004).

Se ha demostrado que filogenias obtenidas del factor de elongación (EF-1 α) son congruentes con otras filogenias moleculares en la recuperación de la monofilia de grupos tales como Metazoa, Fungi, Magnoliophyta y Euglenozoa, este marcador es importante por proveer una sección altamente informativa entre especies muy relacionadas (Knutsen *et al.*, 2004; Geiser *et al.*, 2004). También secuencias codificantes de genes como calmodulina (CaM), utilizada por O'Donnell *et al.* (2000), han sido utilizadas para el análisis filogenético molecular del complejo *Fusarium fujikuroi* y otras especies de *Fusarium*.

En los últimos años, uno de los cebadores más empleados en la identificación molecular de hongos del género *Fusarium* es el factor de elongación de la traducción 1 α (TEF-1 α), que muestra un alto nivel de polimorfismo entre especies estrechamente relacionadas, cuando se comparan con genes que codifican proteínas como la calmodulina, β tubulina y la histona H3. Estos fueron inicialmente desarrollados en los hongos para investigar linajes dentro del complejo *Fusarium oxysporum* (O'Donnell *et al.*, 1998; Aoki *et al.*, 2014).

2.5 Patogenicidad del género *Fusarium*

Fusarium es uno de los géneros que contiene mayor cantidad de especies fitopatógenas. Este hongo pasa a través de cambios morfológicos y fisiológicos para adaptarse a nuevos ambientes, puede sobrevivir en forma de micelio o clamidosporas se encuentra distribuido en el suelo y materia orgánica de todo el mundo (Leslie y Summerell 2006; Castillo *et al.*, 2005).

La patogenicidad ha sido definida como la capacidad relativa que tiene un microorganismo fitopatógeno para producir una enfermedad (Agrios, 2005). Cuando se cree que un microorganismo puede ser la causa de una enfermedad y no existen estudios previos que lo comprueben, se sigue la metodología de los postulados de Koch (1876), para verificar o no la hipótesis que él o los microorganismos son la causa para que se produzca la enfermedad y determinar la relación planta-fitopatógeno (Hernández, 2010).

Algunas especies del género *Fusarium* son habitantes del suelo, se reconocen por su impacto económico negativo en la agricultura mundial, ya que son los agentes causales del marchitamiento vascular y pudrición basal de una gran variedad de plantas. *Fusarium oxysporum*, cumple dos fases importantes: una saprófita muy activa durante la que puede vivir en el suelo y en los residuos vegetales por espacio de 20 años y puede inhabilitar el uso del suelo para nuevos cultivos hospederos y, una fase parasítica patógena de las plantas (García, 2011; Gonzáles-Cárdenas, 2005). Esta especie sin duda, es una de las más importantes económicamente de todo el género *Fusarium* (Leslie y Summerell, 2006).

III MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Área de estudio y muestreo: Se hicieron recolecciones de plantas de arándano en ocho comunidades y se realizaron muestreos 5 huertos por cada comunidad. Dichas comunidades pertenecen a los municipios de Los Reyes, Tacámbaro, Tangancícuaro, Zamora de Hidalgo, Ziracuaretiro, Salvador Escalante y Morelia. Michoacán, México, la selección de los huertos de arándano fue al azar, básicamente se consideró a aquellos en donde se observaron plantas con síntomas de enfermedad o muertas, entre los síntomas detectados fueron amarillamiento, clorosis y necrosis de hojas.

3.2 Ubicación del área experimental

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de fitopatología de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en Uruapan, Michoacán y en los huertos de las comunidades mencionadas.

3.3 Muestreo del material biológico

Por cada sitio de muestreo, las plantas de arándano fueron recolectadas completas y sólo las que presentaban síntomas de la enfermedad, y variaba entre 3 a 5 plantas por sitio de muestreo. Cada planta enferma fue depositada en una bolsa de plástico Ziploc® y fue etiquetada de acuerdo al sitio de recolección, comunidad y municipio, fecha de recolecta y posteriormente fueron trasladadas al laboratorio para procesarlas.

3.4 Elaboración de medios de cultivo

Los medios utilizados en este estudio fueron los recomendados por Leslie y Summerell (2006), para el análisis y caracterización del género *Fusarium*: PDA (papa-dextrosa-agar), AA (agar-agua 2 %), CLA (agar hojas de clavel), SNA (Spezieller Nährstoffarmer Agar), estos medios se utilizaron para reproducir la morfología descrita reportada para este género. Se prepararon los medios se esterilizaron con ayuda de una autoclave, a 121 °C durante 20 minutos. Los medios se vaciaron en cajas Petri Klinikus® de 100 x 15 mm y 60 x 15 mm en una campana de flujo laminar y se expusieron a luz UV (luz ultravioleta) hasta que se solidificaron, posteriormente se almacenaron a una temperatura de 4 °C hasta su uso.

3.5 Aislamiento de fitopatógenos

Se utilizó campana de flujo laminar para realizar los aislamientos a partir de las partes afectadas de la planta en especial de raíces y corona, de acuerdo al protocolo de Agrios

(2005). Los fragmentos de raíces y corona de cada planta infectada fueron lavados y desinfectados con hipoclorito de sodio al 33 % elaborado a partir de una solución comercial, después se colocaron cinco trozos del material de forma equidistante en una caja de Petri con medio de cultivo PDA.

3.5.1 Purificación de cepas

Cuando se observó crecimiento micelial en PDA, se separaron las diferentes colonias de hongos que crecieron, mediante cortes delgados con un bisturí, los cuales se pasaron a nuevas cajas Petri con el mismo medio de cultivo para dejarles crecer a una temperatura ambiente.

De las cepas obtenidas se observó el tipo de crecimiento y coloración e hicieron preparaciones en laminillas, se observaron al microscopio con la finalidad de hacer una discriminación y separar aquellas que tienen ó no similitud. Se observaron características similares a las descritas para el género *Fusarium*, estas cepas se transfirieron a partir de puntas de hifas a cajas Petri con medio de cultivo SNA en las cuales crecieron durante tres semanas.

3.5.2 Cultivos monospóricos y preservación del patógeno

De las cajas de medio SNA con tres semanas de crecimiento se tomó micelio con ayuda de un sacabocados, se colocaron en tubos de ensayo con 5 mL de agua destilada estéril, se agitaron manualmente para obtener una suspensión de conidios, de la cual se tomaron 30 µL con una micropipeta y se colocaron en cajas Petri con medio AA. Las cajas se incubaron a 25 °C por un periodo de 20 horas, al término de este tiempo se transfirieron por separado conidios germinados a medio de cultivo SNA, al cual se le colocaron dos piezas de un cm² de papel filtro (Whatman No. 4) estéril sobre la superficie del medio nutritivo, esto con la finalidad de que desarrollara un mayor número de estructuras reproductivas. Se depositó un conidio por caja y se incubaron a 25 °C por tres semanas (Leslie y Summerell, 2006; Ávila, 2009; Olalde-Lira *et al.*, 2017).

3.6 Caracterización cultural y morfológica del género *Fusarium*

Para la caracterización se consideró el crecimiento, color y forma de las colonias, así como las características microscópicas de las estructuras reproductivas del patógeno (conidios, fiálides, clamidosporas, hifas y conidióforos).

3.6.1 Características culturales en medio PDA

Se inocularon 2 μ L de la suspensión de conidios en glicerol a 25 % en medio PDA, se determinó el tipo y espesor del micelio, el color de la colonia y pigmentación del agar. Se hicieron revisiones a los 15 días.

3.6.2 Características morfológicas en medio CLA

De igual manera se inocularon 2 μ L de la suspensión de conidios en glicerol al 25 % en medio CLA. Se hicieron preparaciones fijas en portaobjetos a los 10, 30 y 60 días de la inoculación, para medir el tamaño (largo y ancho) de macroconidios, microconidios y clamidosporas en caso de presentarse. Se determinó la forma, tipo de célula basal, tipo de célula apical y número de septos de los macroconidios y microconidios.

3.6.3 Tasa de crecimiento

Para cada aislamiento estudiado se inocularon 2 μ L de la suspensión de conidios en glicerol al 25 % en cajas con medio PDA, Las cajas se incubaron a 25 °C en oscuridad hasta que llenaron de micelio toda la superficie del medio. Se tomaron discos de micelio de 1 cm de diámetro y se colocaron en cinco cajas Petri con medio PDA, éstas se incubaron a 25 °C, el crecimiento se midió a las 72 horas con ayuda de un Vernier.

3.7 Extracción de ADN

Para la producción de micelio, se transfirieron 2 μ l de suspensión monoconidial a cajas Petri con medio de cultivo PDA, se incubaron a 25 °C durante 72 horas, el micelio se pulverizó en morteros con nitrógeno líquido para lograr la ruptura de las células de manera mecánica, el polvo obtenido se guardó en tubos eppendorf. El ADN se extrajo con buffer bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB 3 %) de acuerdo al protocolo de Doyle y Doyle (1990).

3.7.1 Cuantificación y análisis de calidad del ADN

La calidad del producto de extracción se valoró en un gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio, mediante electroforesis a 80 volts por 30 minutos y se observó en un transiluminador. La concentración y pureza se midieron con ayuda de un espectrofotómetro Smart Spec® de BioRad®.

3.7.2 Reacción en cadena de la polimerasa

El proceso de PCR múltiple se llevó a cabo con la utilización de primers específicos, (Cuadro 1).

Cuadro 1. Primers usados para la identificación de cepas de *Fusarium* spp., de plantas de arándano.

PRIMERS	SECUENCIAS (5'-3')	References
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White et al. 1990
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
H3-1a	ACTAAGCAGACCGCCCGCAGG	Glass and Donaldson, 1995
H3-1b	GCGGGCGAGCTGGATGTCCTT	
Cal-228F	GAGTTCAAGGAGGCCTTCTCCC	O'Donnell, et al. 2000
Cal-737F	CATCTTTCTGGCCATCATGG	
EF-1 α	ATGGGTAAGGARGACAAGAC	O'Donnell et al. 1998
EF-2	GGARGTACCAGTSATCATGGT	

En cada muestra se le adicionó 200 ng del ADN de cada cepa, 2.5 μ L de primer forward, 2.5 μ L de primer reverse a una concentración final de 200 nM, se le adicionaron 44 μ L de la mezcla de reacción Platinum® PCR SuperMix®.

La PCR se llevó a cabo en un termociclador Thermal Cycler C1000® de BIORAD® bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C por 4 minutos, 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 10 segundos, alineamiento a 57 °C por 30 segundos, extensión a 72 °C por 1 min y 1 ciclo de extensión final a 72 °C por 2 min. La amplificación se valoró en un gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio, mediante electroforesis. Para la amplificación se utilizó el protocolo estandarizado para hongos por Ordaz (2017) en el laboratorio de fitopatología de la facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”.

3.7.3 Secuenciación

El producto de la PCR se envió al laboratorio de Macrogen Inc. en Seúl, Corea del Sur, para su purificación y secuenciación, las secuencias se corrieron bidireccionalmente.

3.7.4 Análisis filogenético

Las secuencias fueron editadas con el software MEGA v7.0.26 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0.26 for Bigger Datasets) (Kumar *et al.*, 2016; Tamura, 2015) y comparadas con secuencias del NCBI (National Center for Biotechnology International) por medio de análisis del software BLAST-N, y se bajaron las secuencias homologas y se alinearon con programa MAFFT v7 versión en línea, se recortaron con el programa BioEdit 7.2 (Hall, 1999), los arboles filogenéticos fueron contruidos usando el método neighbour joining (NJ) y los modelos de sustitución para ITS1 y 4 (rDNA) Jukes-Cantor (JC); H3 Tamura Ney (TN93+G), CaM y EF-1 α Kimura (K2) con base a los análisis de máxima parsimonia y máxima verosimilitud con el programa MEGA v7.0.26.

Concatenado

Los arboles de distancia derivados de la combinación de secuencias parciales de los genes ITS1 y 4 (rDNA), H3, CaM y EF-1 α , obtenidas de las cepas del genero *Fusarium*, se construyeron con el método Máxima verosimilitud y Máxima parsimonia y el modelo de sustitución General Time Reversible con distribución gamma (GTR+G) con 1000 repeticiones en bootstrap y 2047 caracteres. El árbol inicial para la búsqueda heurística se obtuvo automáticamente con la aplicación del algoritmo neighbor-join (NJ).

3.8 Caracterización patogénica

Las cepas obtenidas del género *Fusarium* a partir de plantas con síntomas de enfermedad se caracterizaron patogénicamente, donde las variables respuestas fueron: virulencia de las cepas y severidad de la enfermedad. Para determinar la virulencia de las cepas se tomaron en cuenta los días que transcurrieron desde la inoculación hasta la aparición del primer síntoma en la planta. Para determinar la severidad de la enfermedad se tomó en cuenta la escala descrita por Lara (2008) la cual representan los grados: planta sana (0), flacidez (1), amarillamiento (2), marchitez apical (3) y muerte de la planta (4).

3.8.1 Obtención del material vegetativo

Las plantas de arándano se obtuvieron a través del laboratorio de propagación *in vitro* perteneciente a la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”, para garantizar que la planta estuviera sana y libre de fitopatógenos.

3.8.2 Preparación del inóculo

De la suspensión monoconidial preservada en glicerol al 25 % se transfirieron 2µl de cada cepa a cajas Petri con medio de cultivo PDA, se incubaron a una temperatura de 25 °C hasta que colonizó toda la superficie del medio, posteriormente para la inoculación de las plantas se utilizó el contenido de una caja Petri en 100 mL de agua destilada estéril y se mezclaron con ayuda de un rotor mecánico durante cinco minutos, se realizó el conteo de conidios por microlitro con ayuda de una cámara de Neubauer.

3.8.3 Inoculación

Una vez listo el inóculo se procedió a inocular cinco plantas de arándano de dos meses de edad a partir de su aclimatación, se depositaron 20 mL de la solución con el fitopatógeno cerca de la raíz de la planta, de tal manera de no ocasionar ningún daño en la misma.

3.9 Análisis de la información

Los datos obtenidos de las variables morfológicas: coloración, forma de la colonia, tipo y espesor de micelio, forma de los macro y microconidios, clamidosporas, hifas enrolladas, fiálides, monofiálides y falsas cabezas, se analizaron en forma cualitativa. Mientras que para las variables tasa de crecimiento de las cepas y datos de virulencia se sometieron a análisis de varianza y comparación de medias de Tukey ($\alpha=0.5$). El diseño experimental utilizado fue completamente al azar. Para el caso de tasa de crecimiento de las cepas se hicieron cinco repeticiones, tomando como unidad experimental una caja Petri. Para virulencia se inocularon cinco plantas por cepa, tomando como unidad experimental una planta. Finalmente la severidad de la enfermedad se determinó con la escala de Lara (2008), en la cual 0 = planta sana; 1 = flacidez; 2 = amarillamiento; 3 = marchitamiento y muerte de puntas; 4 = muerte de planta. Los datos de virulencia se sometieron a un análisis de varianza, las medias de los tratamientos se conmararon con Tukey ($p\leq 0.05$) los análisis de varianza se hicieron con el programa SAS (SAS, 2002) v9.

Las secuencias se editaron con el software MEGA 7.0.26 (Kumar *et al.*, 2016; Tamura, 2015), se alinearon con el programa MAFFT V7 versión en línea, se recortaron con el programa BioEdit 7.2 (Hall, 1999) se buscó el mejor modelo de evolución y se realizó la construcción de los árboles de máxima versomilitud y máxima parsimonia con MEGA 7.0.26. Para la concatenación de los diferentes fragmentos se realizó con el programa Seaview 4 (Gouy *et al.*, 2010).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este estudio de identificación y caracterización de *Fusarium* spp., fitopatógeno de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.), se presentó variación en los resultados de acuerdo a la hipótesis y objetivos planteados y metodología empleada, a continuación, se explica y detalla cada uno de ellos.

4.1. Obtener cepas de raíces de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) con síntomas de pudrición radicular en la región productora de Michoacán, México (Objetivo 1)

Los principales síntomas observados en campo por problemas en la raíz fueron: marchitamiento de las hojas, este síntoma se presenta en forma generalizada en la planta de manera descendente, posteriormente las hojas presentan un amarillamiento o plateado brillante. Sin embargo, en ocasiones se acelera el síntoma y puede presentarse amarillamiento o plateado sin pasar previamente por la marchitez, seguido de la abscisión o necrosis. La necrosis comienza por el borde de la hoja de manera concéntrica hasta que se necrosa totalmente, conforme avanza la necrosis, el limbo se va enrollando del borde paralelo a la nervadura primaria hacia el centro de tal manera que el envés queda expuesto al sol. El tallo comienza a necrosarse de manera ascendente, se torna de un color café a marrón hasta secarse por completo y eventualmente muere. La sintomatología en la planta comienza en el ápice de algunas de las ramas, esto quiere decir que la infección del fitopatógeno en el tallo es unilateral debido a que la diseminación lateral y radial del hongo es inhibida por las paredes celulares y otras barreras laterales (Baayen *et al.*, 1985). En verano es muy frecuente que se presente decaimiento lento de las plantas, acompañado de clorosis o follaje rojizo a plateado brillante de algunas o todas las ramas (Cisternas y France, 2009) (Figura 2).

Del material vegetativo con síntomas de enfermedad se obtuvieron 23 cepas, a cada aislado se le asignó una clave de acuerdo a su procedencia y número de colecta, esto con la finalidad de facilitar el manejo para su identificación en el cepario que se integró (Cuadro 1).



Figura 2. Síntomas en follaje (A y B) y corona (C) en plantas de arándano infectadas con fitopatógenos de la raíz.

Cuadro 2. Características orográficas del sitio de recolección de 23 cepas de *Fusarium* spp., aisladas de plantas de arándano.

Comunidad	Clave*	Altitud (msnm)	Precipitación mL/m ²	Coordenadas
Los Reyes	LRE1	1240	900	N19°35' W102°28'
Los Reyes	LRE2	1240	900	N19°35' W102°28'
Los Reyes	LRE3	1240	900	N19°35' W102°28'
Tangancicuaro	TAN4	1700	1000	N19°53' W102°12'
Tangancicuaro	TAN5	1700	1000	N19°53' W102°12'
Tangancicuaro	TAN6	1700	1000	N19°53' W102°12'
San Ángel Zurumicapio	SAN7	1609	1200	N19° 26' W101° 53'
San Ángel Zurumicapio	SAN8	1609	1200	N19° 26' W101° 53'
San Ángel Zurumicapio	SAN9	1609	1200	N19° 26' W101° 53'
Zamora de Hidalgo	ZAM10	1560	1000	N19°59' W102°17'
Zamora de Hidalgo	ZAM11	1560	1000	N19°59' W102°17'
Ziracuaretiro	ZIR12	1340	1200	N19°26' W101°55'
Ziracuaretiro	ZIR13	1340	1200	N19°26' W101°55'
Ziracuaretiro	ZIR14	1340	1200	N19°26'

				W101°55'
Tacámbaro	TAC15	1640	1150	N19°14' W 101°28'
Tacámbaro	TAC16	1640	1150	N19°14' W 101°28'
Tiripetío	TIR17	2020	1000	N 19°32' W 101°20'
Tiripetío	TIR18	2020	1000	N 19°32' W 101°20'
Ziracuaretiro	ZIR19	1340	1200	N19°26' W101°55'
Zirahuén	ZIH20	2090	1118	N19°27' W101°43'
Zirahuén	ZIH21	2090	1200	N19°27' W101°43'
Zirahuén	ZIH22	2090	1118	N19°27' W101°43'
Zirahuén	ZIH23	2090	1118	N19°27' W101°43'

*Indica la clave de la cepa de *Fusarium* spp., aislada; las tres letras mayúsculas corresponden al nombre del municipio y localidades, los números arábigos corresponden al número consecutivo de recolecta de cepa; LRE=Los Reyes, TAN=Tangancícuaro, SAN=San Ángel Zurumucapio, ZAM=Zamora, ZIR=Ziracuaretiro, TAC=Tacámbaro, TIR=Tiripetío, ZIH=Zirahuen.

4.2. Caracterizar e identificar morfológica y molecularmente las cepas obtenidas a partir de raíces de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) (Objetivo 2)

Las características fueron muy variables entre sí y estuvieron en función de la especie identificada como se detalla a continuación.

4.2.1 Características culturales en medio PDA

Las 23 cepas obtenidas presentaron crecimiento radial con micelio abundante y denso, esto coincide con las características reportadas por Leslie y Summerell (2006) y Summerell *et al.* (2003), para el género *Fusarium*, mientras que las cepa TAN4 y TAN6 presentaron un crecimiento escaso y postrado en el medio, también se observó crecimiento en círculos concéntricos y estrías, para estas características no existen reportes en este género, como muestran los resultados es un factor de variación morfológica que puede ser analizado en trabajos descriptivos similares. Las cepas que presentan estrías fueron: LRE1, 3, SAN9, ZIR13, ZIR14, TAC15, TAN5 y 6; ZAM10, y ZIR12. Círculos concéntricos: LRE2, TAN5 y 6, TIR17 y 18, ZIR19, ZIH20, 21, 22, 23, en algunos casos tuvieron ambos crecimientos como en la cepa TAN5, debido a que el medio de cultivo PDA es rico en carbohidratos, permite un desarrollo de micelio ideal para la observación de sus características (Leslie y Summerell, 2006), así los aislados a partir de planta de arándano, produjeron micelio abundante, denso, algodonoso, aéreo, flocooso en algunos (Figuras 3 y 4).

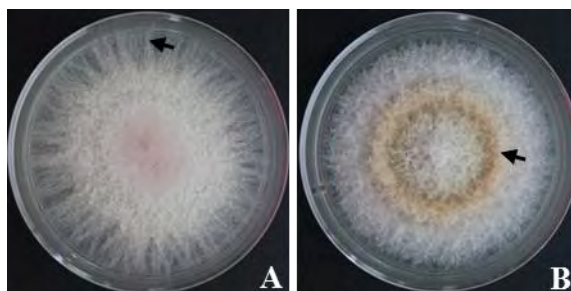


Figura 3. Estrias y círculos observados en micelio de *Fusarium* estrias (A): y círculos concéntricos (B).

4.2.2 Color de la colonia

El color anverso de las colonias se describió de acuerdo con las tablas de colores de Kornerup y Wanscher, (1978), y fue la siguiente: 8.6 % presento un color blanco violeta, 8.6 %, rojo pálido, 34.7 % blanco, 30.4 % presentaron tonalidades naranja y 17.39 % blanco rojizo, se formaron cinco grupos, (Cuadro, 1A).

Leslie y Summerel (2006) indican que la coloración del micelio varía dependiendo de las condiciones ambientales, luz, medios nutritivos y temperatura en las que se desarrollen las cepas. Las colonias mostraron una alta variación en el color de micelio con diferentes tonalidades de blanco violeta, rojo pálido, blanco, tonalidades naranja y blanco rojizo. La variación en el color de la colonia es una característica del género *Fusarium*, pero no es considerada determinante para la identificación de las especies, las condiciones ambientales son factores importantes para la producción de pigmentos por especies de *Fusarium*; así algunas especies son sensibles a la luz mientras que otras lo son al pH del medio de cultivo, lo que ocasiona que las colonias puedan variar ampliamente en su coloración (Leslie y Summerel, 2006; Booth, 1975) (Figura 4).

4.2.3. Características morfológicas en medio CLA

Las 23 cepas de *Fusarium* presentaron variabilidad morfológica en cuanto al tamaño, forma y posición de estructuras como macro y microconidios, clamidosporas e hifas enrolladas, como se detalla a continuación:

Macroconidios

Los macroconidios fueron producidos en medio de cultivo CLA, se presentaron de manera escasa en todas las cepas, estos se produjeron dispersos en el medio y no en estructuras que aglutinaran los esporodoquios donde se producen.

Los macroconidios fueron alargados, ligeramente curvados y septados. El número de septos observados fue de uno a cinco en una cepa que fue la ZIH22, y las restantes presentaron desde uno a cuatro septos. Las cepas TAN4, ZAM11, ZIR12, TIR18 y ZIH20 presentaron un septo, y la TAC16 dos septos, tres septos LRE1, 2, 3, TAN5, SAN7, y 8, ZAM10, ZIR14, TAC15, TIR17 y ZIH21 y 23 y de cuatro septos las cepas TAN6, SAN9 y ZIR13, la ZIR19 no produjo macroconidios. La forma del ápice de los macroconidios fue de pie en la mayoría a excepción de las LRE1 y ZIR14 que presentaron forma de gancho, y la ZIH23 forma papilada. En la célula basal se distingue claramente una muesca en forma de “pie”, en todos los macroconidios producidos en todas las cepas (Figura 4; Cuadro 1A).

En este estudio se presentó alta variación en la forma y número de septos de los macroconidios. Estas estructuras son el carácter morfológico más importante en la identificación de especies de *Fusarium*, en algunos casos la morfología de la espora es suficiente para identificar a nivel de especie. En medio de cultivo CLA suelen ser uniformes y abundantes en especies como *Fusarium oxysporum* y *F. solani*, por lo que se recomienda este medio para su caracterización (Leslie y Summerell, 2006; Ochoa *et al.*, 2012; Martínez *et al.*, 2015), *Fusarium oxysporum* presenta usualmente tres septos y la célula basal en forma de pie, célula apical cónica curvada y algunas veces con un ligero gancho, la especie de *F. subglutinans* sus macroconidios generalmente presentan tres septos, la célula apical de forma curva y la basal poco desarrollada (Leslie y Summerell, 2006) (Figura 4).

Microconidios

Estas estructuras también fueron producidas en medio de cultivo CLA, la presencia de microconidios es un carácter considerado importante para la identificación de las especies de *Fusarium*, debido a que no en todas se producen (Leslie y Summerell, 2006). En este caso, la mayoría de las cepas estudiadas los produjeron de manera abundante, a excepción de las cepas SAN8, 9 y la ZIR13 que presentaron en menor cantidad, fueron de forma ovalada, reniforme, piriforme, y ovoide, con o sin septos y dispersos en el medio nutritivo, ovaladas en las cepas LRE1,2, y3, TAN4, 5 y 6, SAN7 y 9, ZAM10, y 11, ZIR12 y 14,

TAC15 y 16, TIR17 y 18, ZIR19, ZIH20, 21, 22 y 23, reniforme las cepas TAN5, SAN8, ZIR13, ZIH22, piriforme LRE3, TAN6 y SAN8 ovoide. Algunos presentaron dos formas como es el caso de la cepa LRE3 tuvo de forma oval y piriforme, (Cuadro 1A).

Características que coinciden con lo reportado por Leslie y Summerell (2006); Britz *et al.*, (2002) y Ochoa *et al.*, (2012) para las especies de *F. oxysporum* debido a que presenta forma oval, elíptica o reniforme y usualmente sin septos, así como para la especie *F. subglutinans* para la cual se reporta forma oval sin septos, sin embargo en el presente estudio solo nueve cepas no presentaron septos (LRE2, 3 y 4, TAN4, SAN9, ZAM10, ZIR19, ZIH20 y 23) y el resto presentaron un septo (Figura 4, Cuadro 1A).

Clamidosporas

Se presentaron de manera abundante en la mayoría de las cepas, sin embargo las cepas TAC16 y TIR17 no las produjeron. De forma esférica, terminales, intercalares y en cadena en todas las cepas. Las clamidosporas son un carácter de importancia en la descripción de algunas especies de *Fusarium* (Leslie y Summerell, 2006). La presencia y abundancia de clamidosporas coincide con las características de *Fusarium oxysporum* que las produce de manera abundante mientras que *F. subglutinans*, *F. sterilihyphosum*, *F. circinatum* y *F. pseudocircinatum* carecen de este tipo de estructuras (Leslie y Summerell, 2006) (Figura 4).

Hifas enrolladas

Siete de las 23 cepas presentaron hifas enrolladas (LRE3, TAN4, SAN7, SAN9, ZIR14, TAC16 y ZH22) de manera escasa en el medio CLA, ya que es un medio pobre en nutrientes, por lo tanto, limita la capacidad de producirlas (Figura 4).

Este carácter de mayor importancia respecto a la caracterización morfológica, las hifas enrolladas son producidas por algunas especies del género *Fusarium* se han reportado *F. sterilihyphosum* y *F. mexicanum*, que causan malformación en la inflorescencia del mango, (Leslie y Summerel, 2006; Betancour *et al.*, 2012; Rodríguez, 2012; Britz *et al.*, 2002). Esta característica morfológica también se presenta en *F. circinatum* y *F. pseudocircinatum*, sin embargo *F. sterilihyphosum* presenta conidios más largos, delgados y clamidosporas ausentes, *Fusarium circinatum* y *F. pseudocircinatum* presentan una pigmentación violeta en el medio de cultivo PDA y ausencia de clamidosporas (Leslie y Summerel, 2006). Las cepas obtenidas en esta investigación difieren de las reportadas porque presentan clamidosporas, a excepción de la TAC16, que presenta hifas enrolladas, pero ausencia de

clamidosporas. La coloración en el medio de cultivo PDA fue diferente a la reportada, los aislados SAN7 y ZIR14 presentaron una coloración blanco amarillenta, LRE3 amarilla, TAN4 blanco grisácea y TAC16 café rojizo, (Kornerup y Wanscher, 1978), coloración no reportada para especies que presentan hifas enrolladas (Leslie y Summerell, 2006). Olalde (2016), reporta esta característica en la especie *F. solani* de color amarilla intenso y con abundantes clamidosporas.

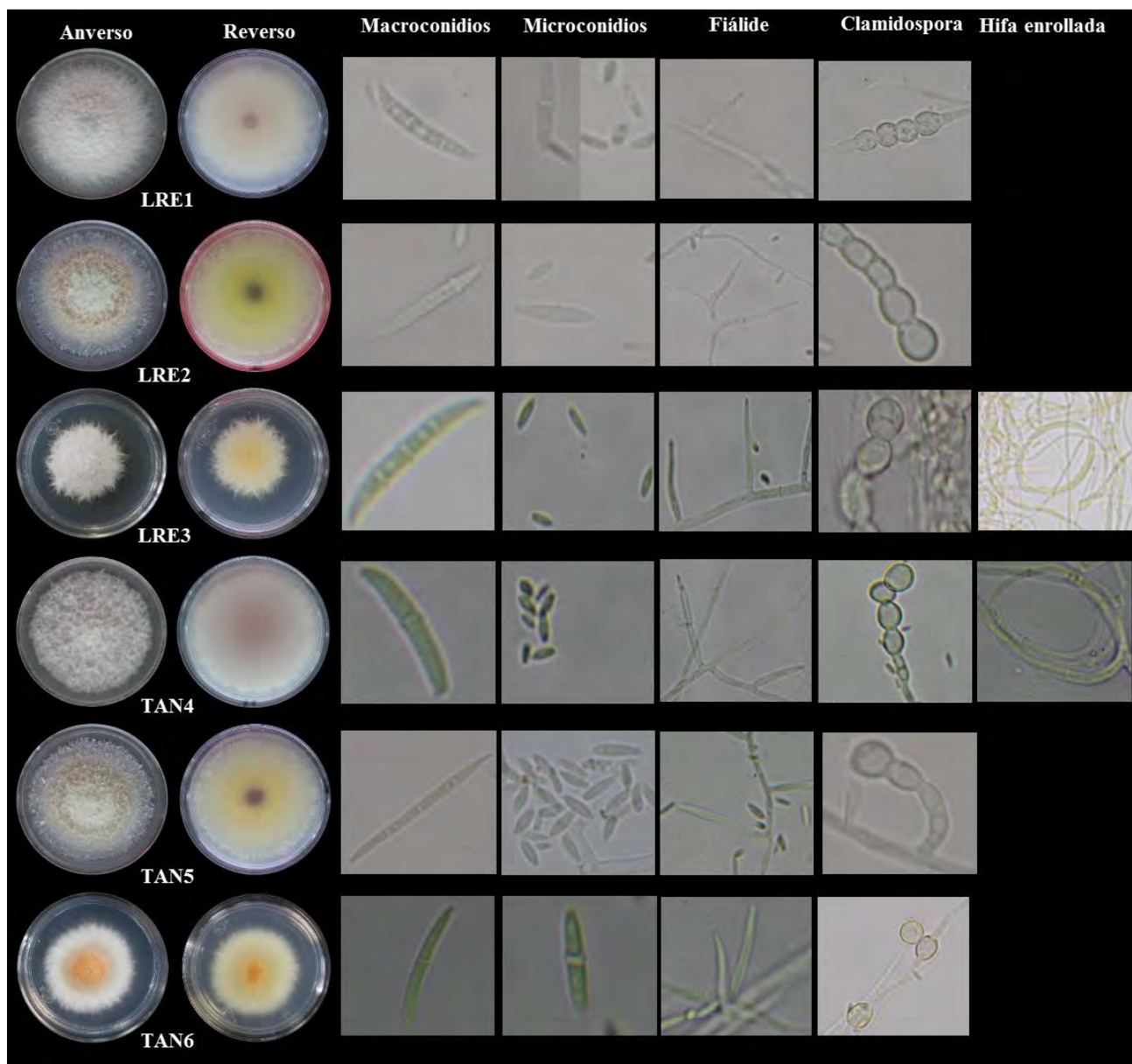
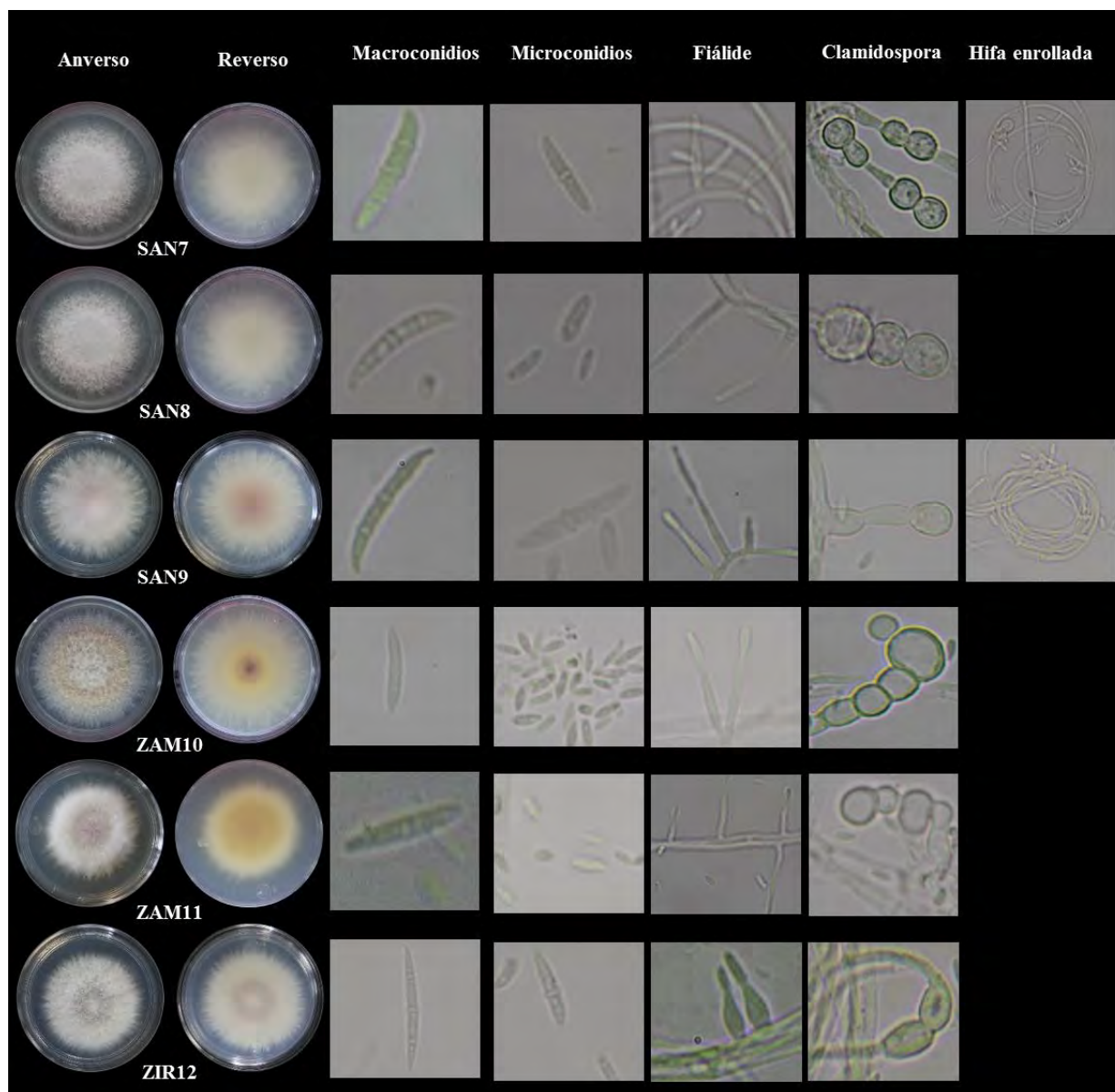
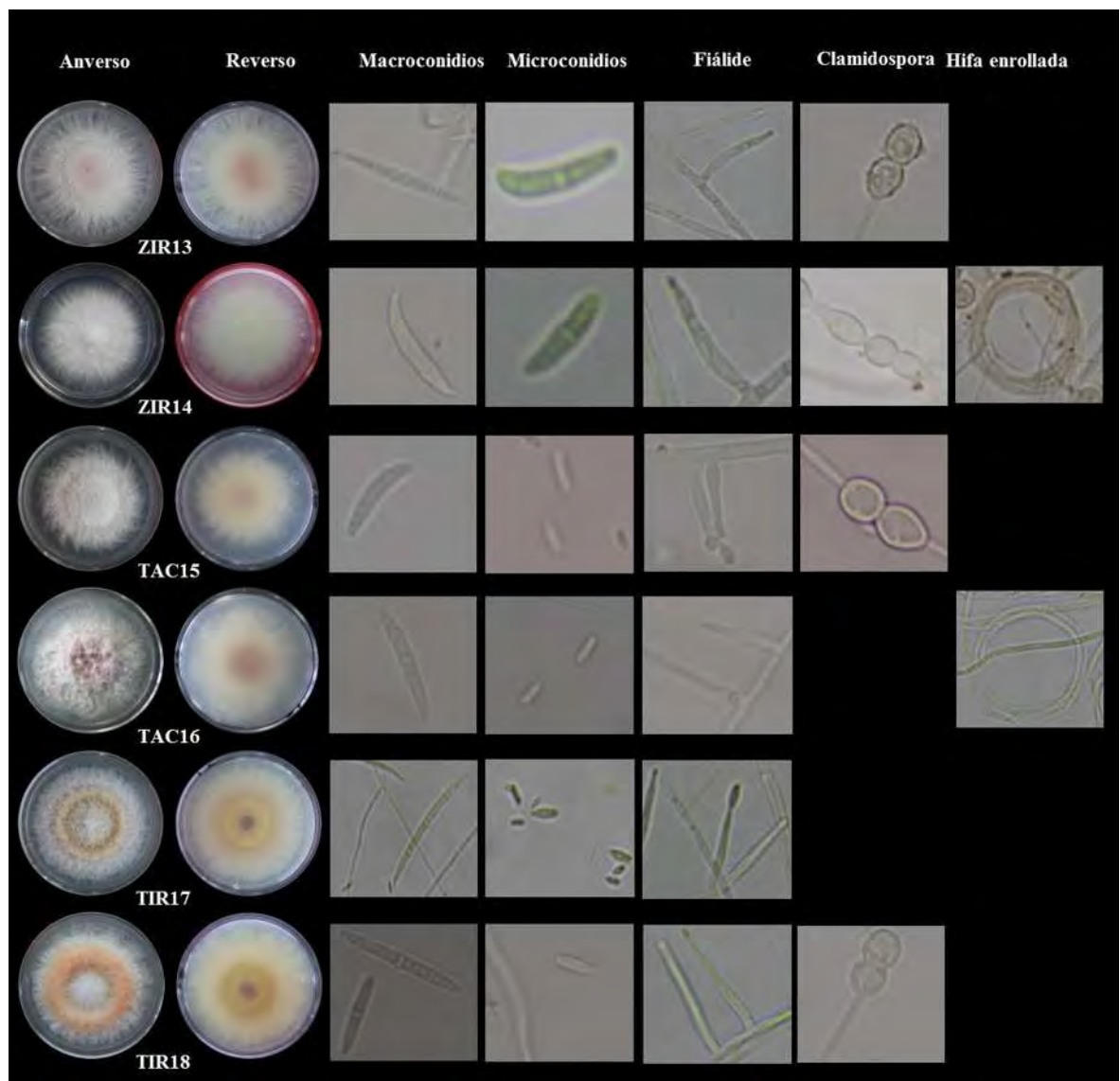


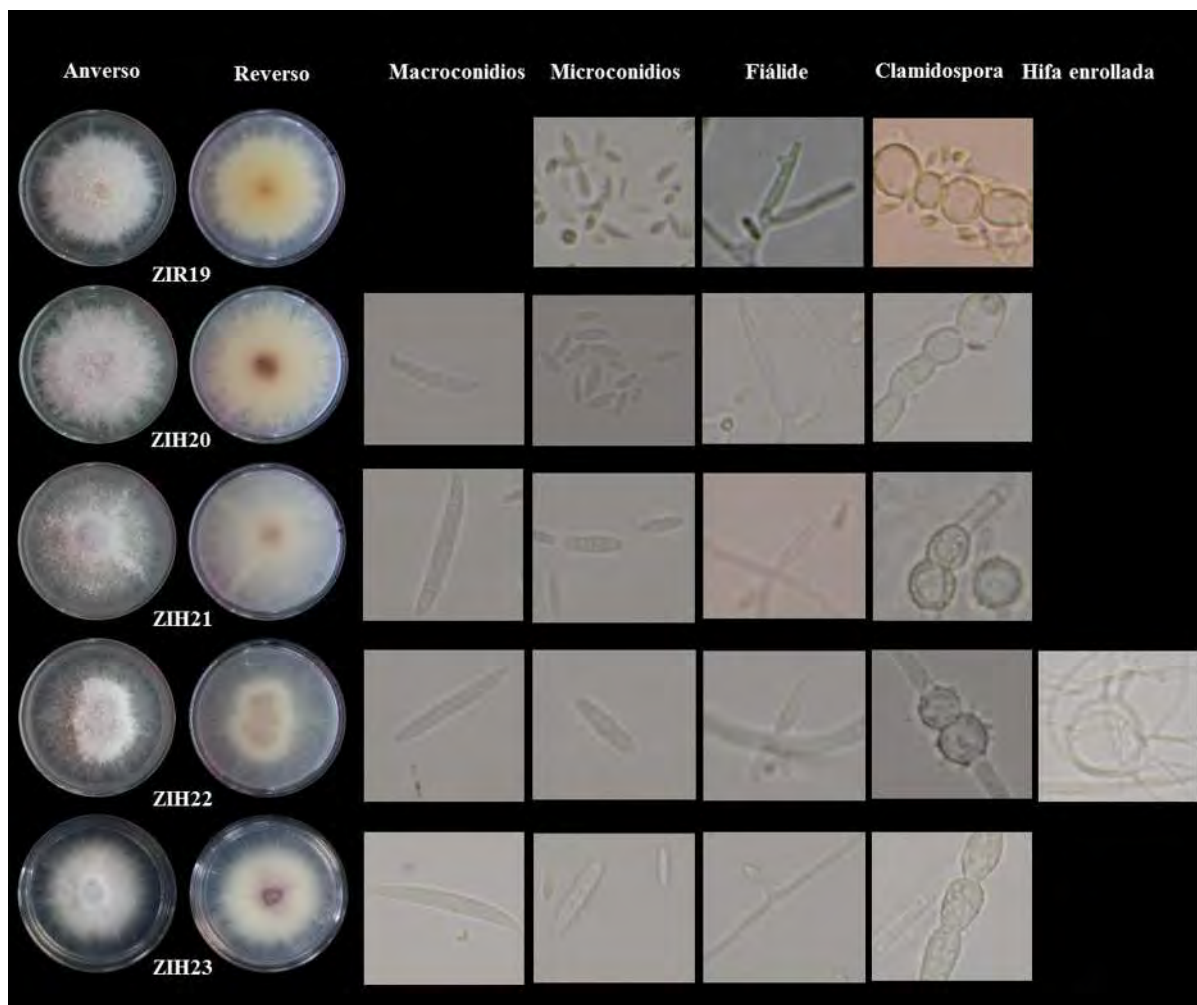
Figura 4. Características culturales de cepas de *Fusarium* spp., en medio PDA y estructuras, obtenidas de planta de arándano.



Continuación Figura 4. Características culturales de cepas de *Fusarium* spp., en medio PDA y estructuras, obtenidas de planta de arándano.



Continuación Figura 4. Características culturales de cepas de *Fusarium* spp., en medio PDA y estructuras, obtenidas de planta de arándano.



Continuación Figura 4. Características culturales de cepas de *Fusarium* spp., en medio PDA y estructuras, obtenidas de planta de arándano.

4.3. Tasa de crecimiento

Los diferentes aislamientos de *Fusarium* spp., no mostraron variación en su tasa de crecimiento micelial, con un rango 0.46-0.54 cm diarios, incubados a una temperatura de 25 °C en oscuridad, por lo que son consideradas de rápido crecimiento. Por lo general la tasa de crecimiento permite distinguir las especies de rápido o lento crecimiento; sin embargo, es posible que debido a la variabilidad dentro de las especies, su lugar de origen o factores externos como luz, posición de la caja Petri en el lugar de incubación, puedan presentarse diferencias tanto en el crecimiento entre las repeticiones de un mismo aislamiento, como en poblaciones distintas aún de la misma especie. (Summerell *et al.*, 2003).

Especies de *Fusarium* spp., aisladas de raíz de aguacate presentaron variación en su tasa de crecimiento entre cepas con lento y rápido crecimiento, se atribuyó esta característica a los

diferentes sitios de colecta donde se obtuvieron cada una de las cepas (Olalde, 2016). En especies de *Fusarium* obtenidas de malformación de la inflorescencia de mango, la tasa de crecimiento presento alta variación entre cepas, de crecimiento rápido y lento evaluadas a las 72 h incubadas a 25 °C, sin embargo se concluye que este carácter no es definitivo para llegar hasta especie (Ávila, 2009).

Fusarium oxysporum es considerado de rápido crecimiento, debido a que puede crecer hasta 1 cm diario (Garcés de Granada *et al.*, 2001). Así al comparar las tasas de crecimiento micelial de las cepas de esta investigación se observó que todas son de crecimiento rápido. Sin embargo esta similitud con *F. oxysporum* por sí sola no es indicativa de que se trate de la misma especie, únicamente se tiene una coincidencia entre ambas en su tasa de crecimiento.

4.4 Caracterización Molecular

El ADN genómico obtenido fue verificado en su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa, (Figura 5). La presencia de una banda de alto peso molecular y la ausencia de barrido en los geles nos demuestran que se obtuvo un DNA integro.

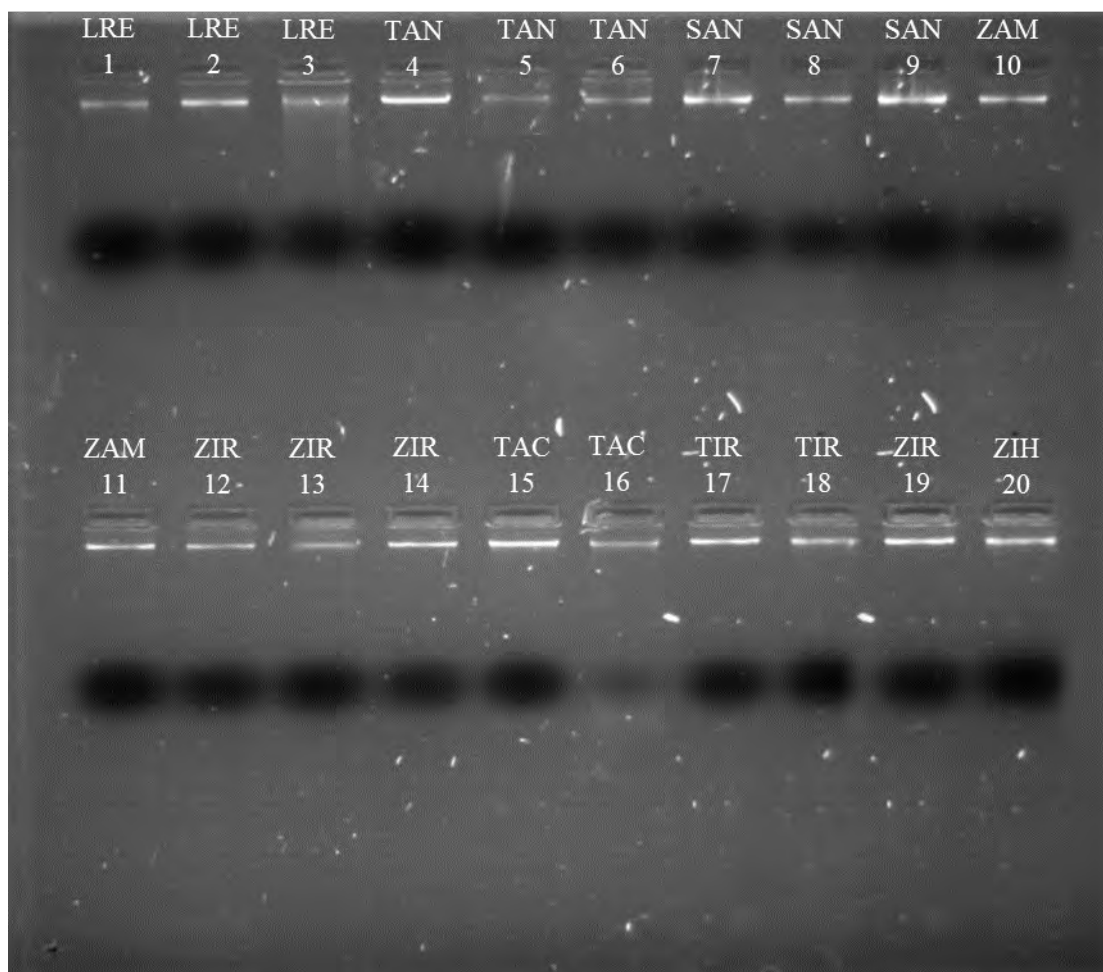


Figura 5. Gel de agarosa al 1 % para visualización de la integridad del DNA genómico extraído de cepas de *Fusarium* spp., obtenidas de raíz de arándano con síntomas de pudrición.

4.4.1 Reacción en cadena de la polimerasa

Las muestras de DNA genómico se emplearon para amplificar por PCR la región ITS del AND ribosomal obtenido un amplicón de 550 pb, de igual manera para los genes CaM y H3 se obtuvieron amplicones de 550 pb y para EF-1 α de 750 pb. La amplificación se visualizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio, (Figura 6).

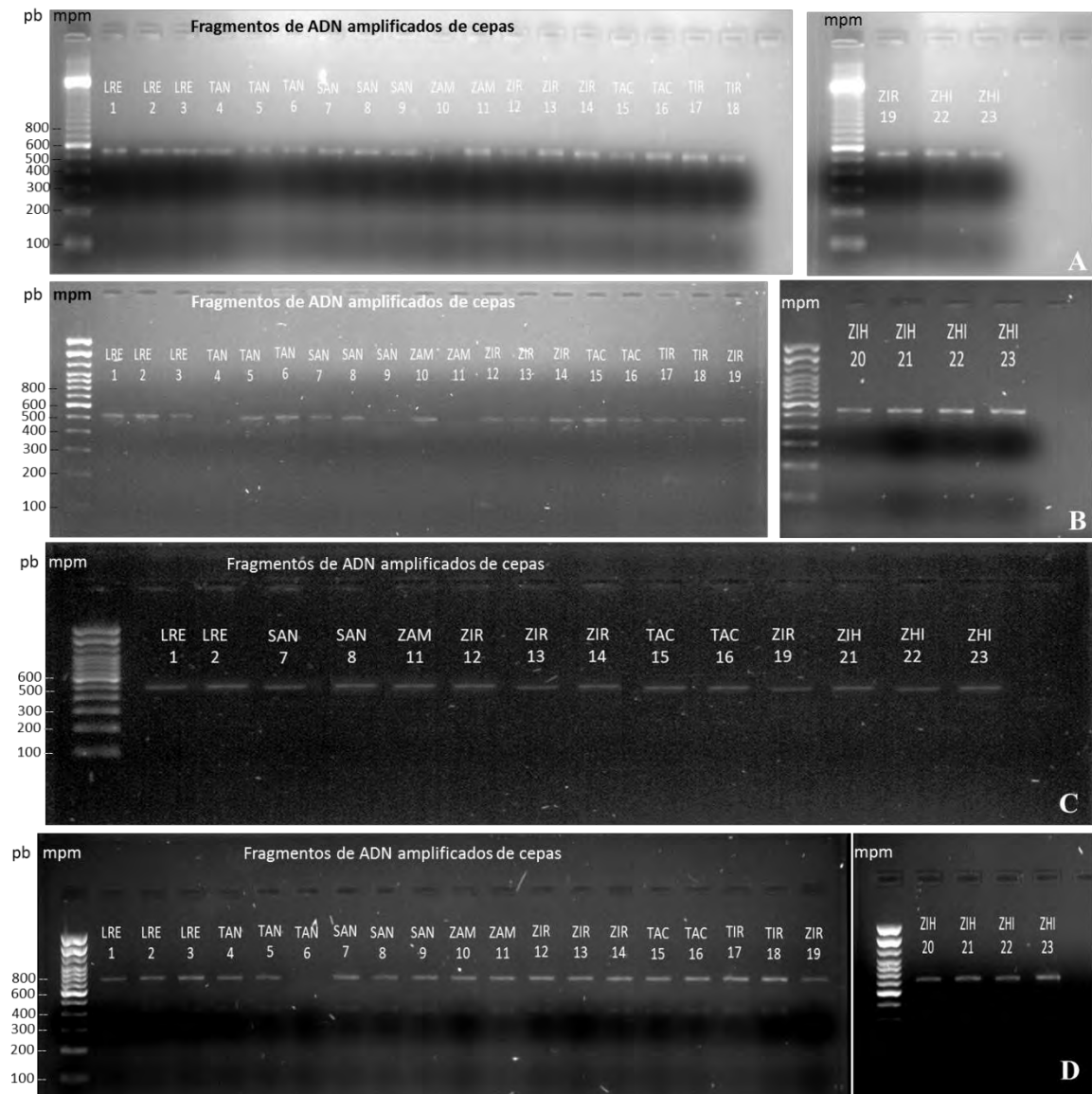


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 2 % y tinción con bromuro de etidio para visualizar los amplicones para A) ITS DNA ribosomal (primers ITS1 eITS); B) H3; C) CaM; D) EF-1 α .

4.4.2 Análisis filogenético

Las secuencias obtenidas se compararon en homología con las secuencias en el GenBank por medio de un análisis BLAST-N, de donde se obtuvieron las que presentaron mayor índice de similitud, así como aquellas que presentaron características morfológicas y con antecedentes relevantes para el estudio.

ITS1 y 4 (rDNA)

En el caso de los ITS1 y 4 (rDNA) de la región codificante, el análisis filogenético se realizó con base a 514 caracteres en un modelo de sustitución Jukes-Cantor (JC), el árbol obtenido en máxima parsimonia mostro una resolución con cinco grupos monofiléticos, dos de ellos para distintas líneas de *F. oxysporum* Schl con nueve cepas (TAN5, SAN7, SAN8, SAN9, ZIR12, ZIR13, TAC15, TAC16 y ZIH22) y un grupo monofiléticos para *F. verticillioides* Nirenberg con dos cepas (ZIR19 y ZIH23) y nueve cepas no se agruparon (LRE1, LRE2, LRE3, TAN4, TAN6, ZAM10, ZAM11, TIR17 y TIR18) (Figura 7).

El árbol para máxima verosimilitud mostró topología distinta, solamente cuatro grupos monofiléticos, dos para de *F. oxysporum* Schl con las cepas (LRE1, LRE2, LRE3, TAN4, TAN5, TAN6, SAN8, ZAM10, ZAM11, ZIR12, TAC16, TIR17, ZIH22), el resto de las cepas no se agruparon, las cepas ZIH20 y ZIH21 no amplificaron (Figura 8).

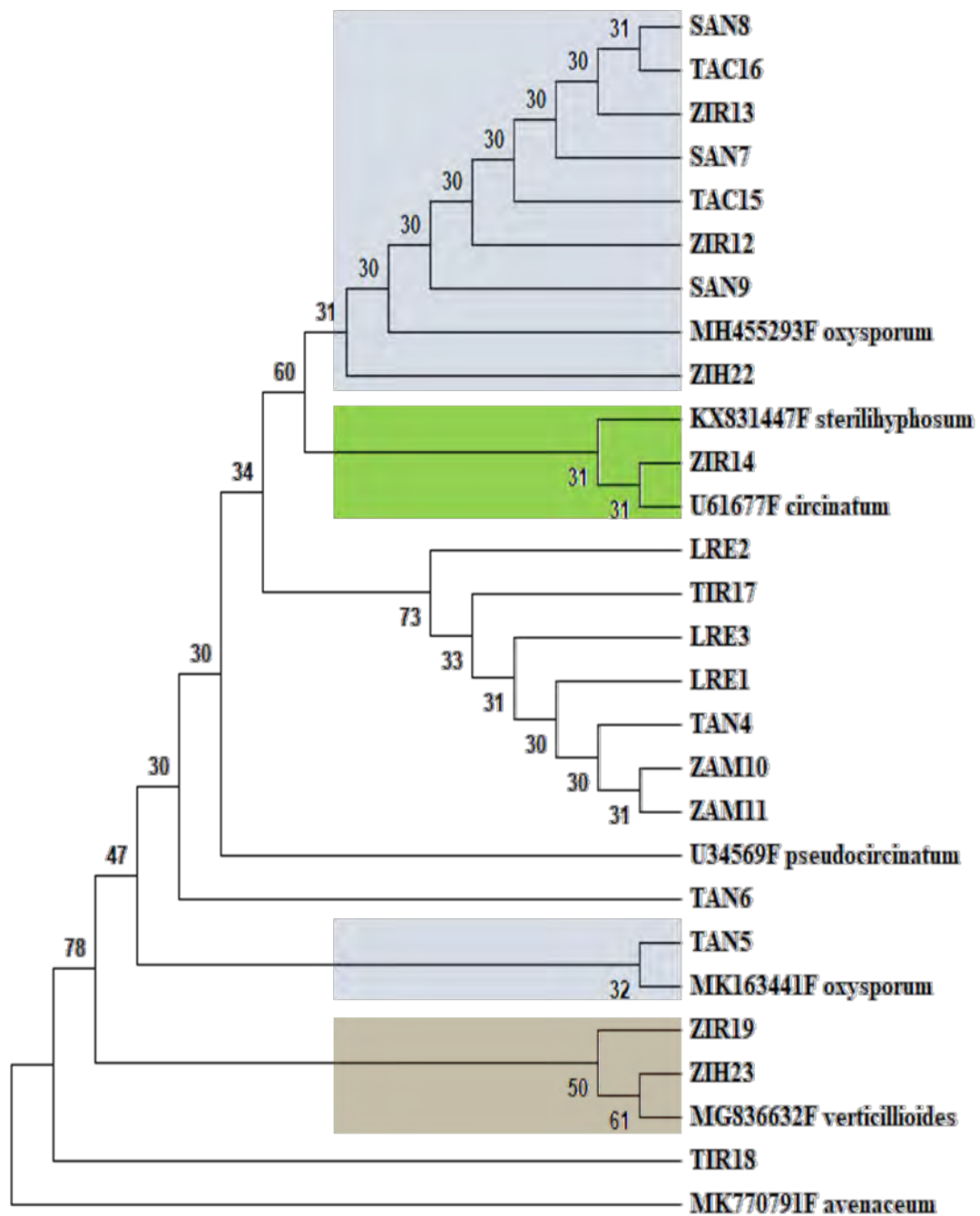


Figura 7. Árbol de distancia derivado de secuencias parciales del género *Fusarium* codificantes para ITS1 y 4 (rDNA), con el método Máxima Parsimonia y el modelo de sustitución Jukes-Cantor (JC) con 1000 repeticiones en bootstrap y 514 caracteres. El árbol inicial para la búsqueda heurística se obtuvo automáticamente aplicando algoritmos neighbor-join (NJ).

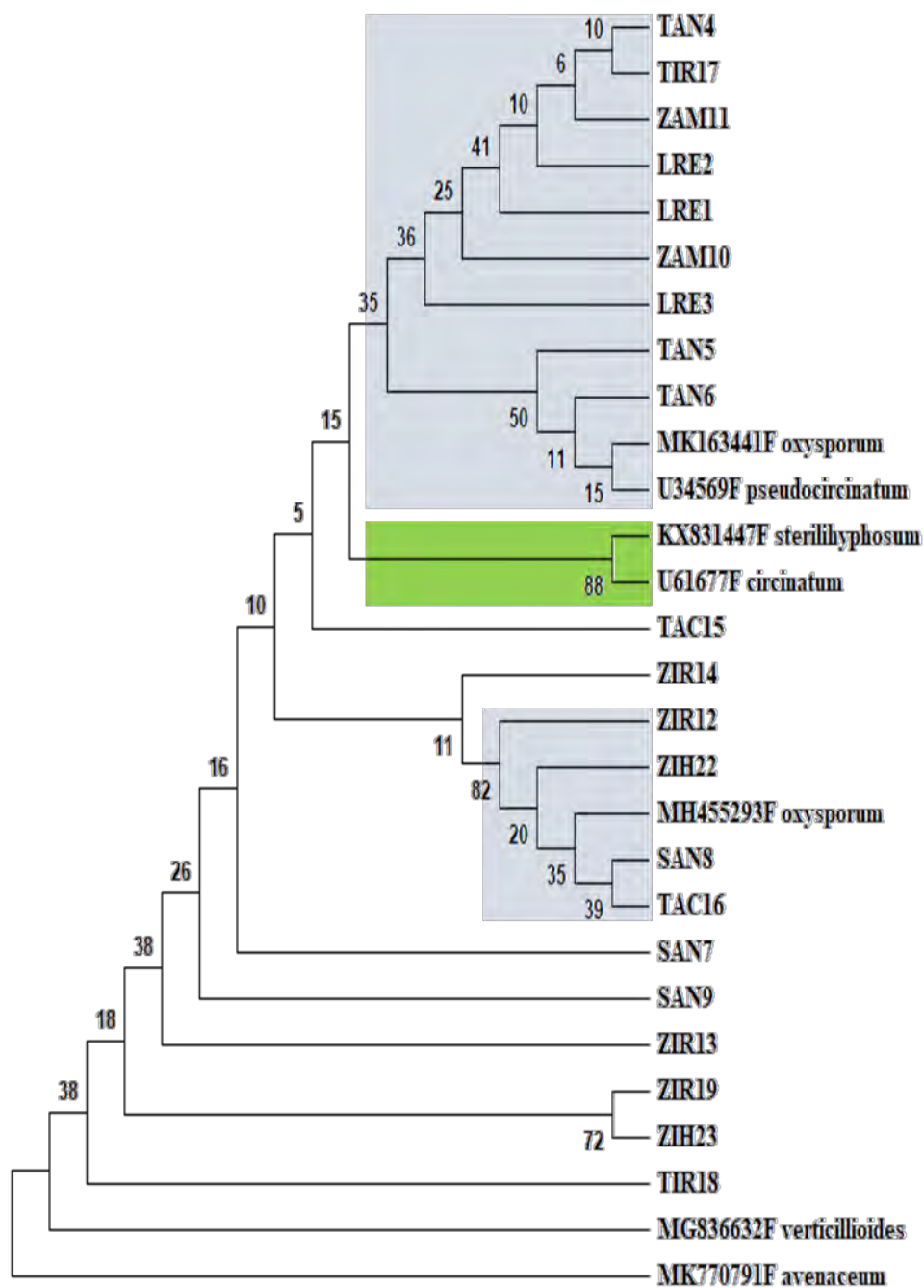


Figura 8. Árbol de distancia derivado de secuencias parciales del genero *Fusarium* codificantes para ITS1 y 4 (rDNA), con el método Máxima Verosimilitud y el modelo de sustitución Jukes-Cantor (JC) con 1000 repeticiones en bootstrap y 514 caracteres. El árbol inicial para la búsqueda heurística se obtuvo automáticamente aplicando algoritmos neighbor-join (NJ)

Histona (H3)

Para el análisis filogenético de la región codificante para histona (H3) se realizó con base a 445 caracteres y un modelo de sustitución Tamura Ney con distribución gama (TN93+G). Los árboles obtenidos del análisis de máxima parsimonia y máxima verosimilitud.

En el árbol de máxima verosimilitud se tuvo una resolución con seis grupos monofiléticos uno de ellos para *Fusarium oxysporum* con las cepas (LRE1, LRE2, ZIR12, ZIR13, ZIR14, TAC15, ZIH21, ZIH22 y ZIH23), tres para las especies de *Fusarium* tomadas del GenBank que comparten el carácter de hifa enrollada (*F. circinatum*, *F. pseudocircinatum*, *F. steririlihyphosum*, *F. subglutinans* y *F. mexicanum*) que no se agrupó con las cepas de este estudio. El resto de las cepas no se agruparon con ninguna especie del género *Fusarium* (LRE3, TAN5, TAN6, SAN7, SAN8, ZAM10, TAC16, TIR17, TIR18, ZIR19 y ZIH20) (Figura 9).

El árbol de máxima parsimonia difirió con el anterior, ya que tuvo una resolución con solo cinco grupos monofiléticos, uno de ellos para *Fusarium oxysporum* con las cepas (LRE1, LRE2, SAN8, ZIR12, ZIR13, ZIR14, TAC15, TAC16, ZIH21, ZIH22 y ZIH23), tres para las especies de *Fusarium* tomadas del GenBank que comparten el carácter de hifa enrollada (*F. circinatum*, *F. pseudocircinatum*, *F. steririlihyphosum*, *F. subglutinans* y *F. mexicanum*) que no se agrupó con las cepas de este estudio y un grupo monofilético que agrupó las cepas (LRE3, TAN5, TAN6, SAN7, ZAM10, TIR17, TIR18, ZIR19 y ZIH20) (Figura 10). Y las cepas TAN4, SAN9 y ZAM11 no amplificaron con este gen.

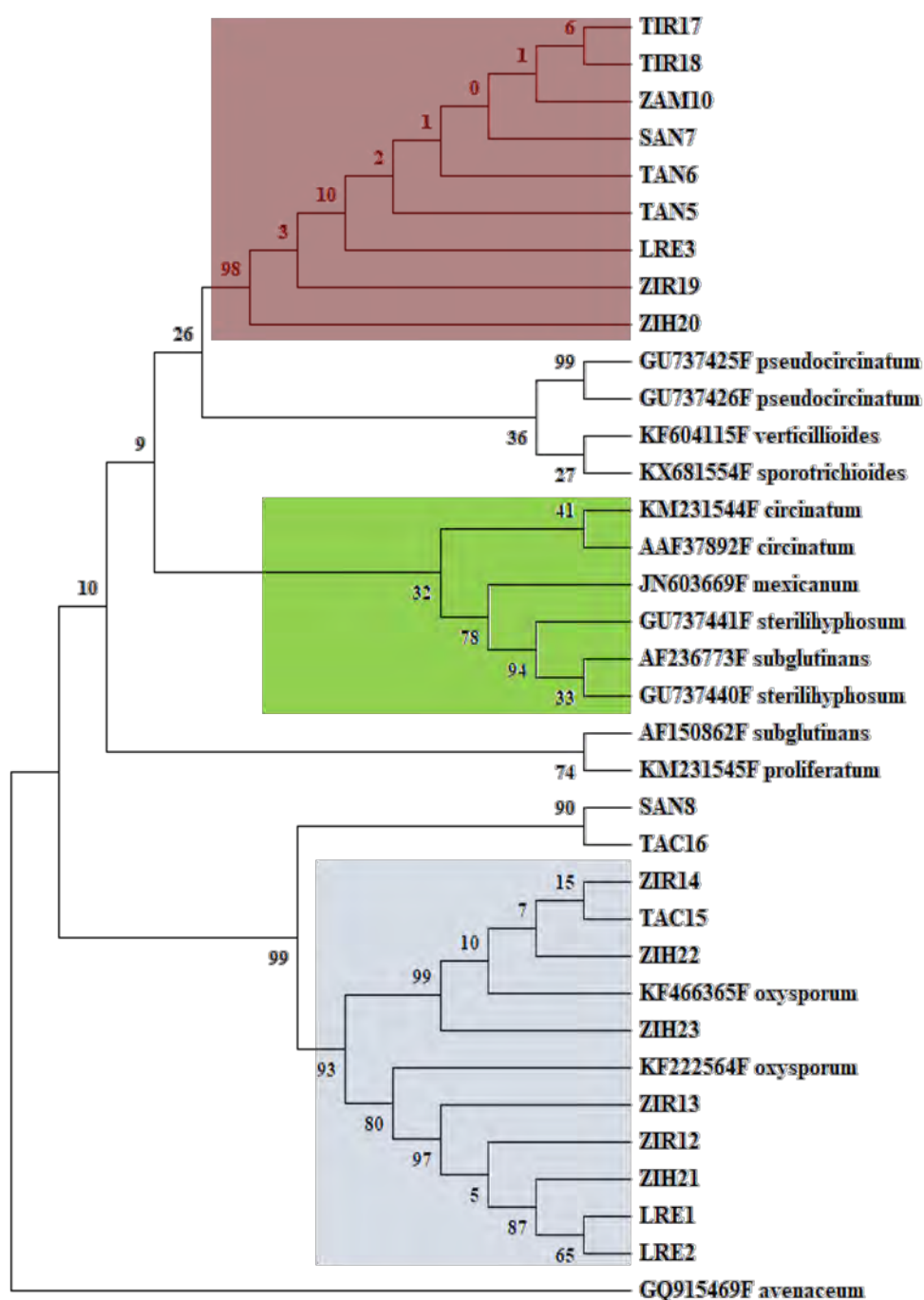


Figura 9. Árbol de distancia derivado de secuencias parciales de H3 obtenidas de las cepas del género *Fusarium*, se construyó con el método Maxima Verosimilitud y el modelo de sustitución Tamura-Nei con distribución gamma (TN93+G) con 1000 repeticiones en sbootstrap y 445 caracteres. El árbol inicial para la búsqueda heurística se obtuvo automáticamente aplicando algoritmos neighbor-join (NJ).

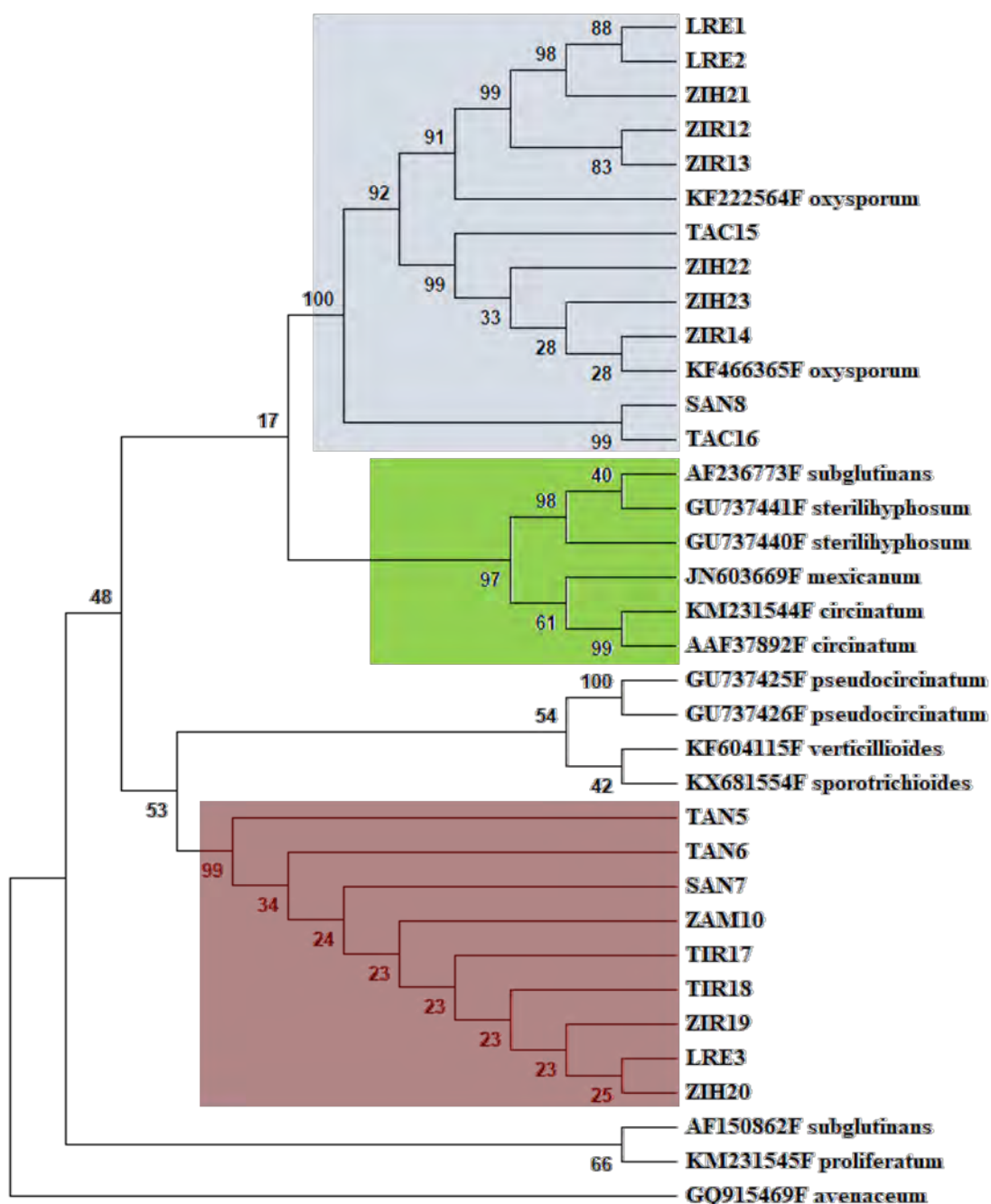


Figura 10. Árbol de distancia derivado de secuencias parciales de H3 obtenidas de cepas del género *Fusarium*, se construyó con el método Maxima Parsimonia y el modelo de sustitución Tamura-Nei con distribución gamma (TN93+G) con 1000 repeticiones en sbootstrap y 445 caracteres. El árbol inicial para la búsqueda heurística se obtuvo automáticamente aplicando algoritmos neighbor-join (NJ).

Calmodulina (CaM)

El análisis filogenético de la región codificante para CaM se realizó con base a 412 caracteres y un modelo de sustitución Kimura (K2). Los árboles obtenidos del análisis de máxima parsimonia y máxima verosimilitud fueron similares, presentan una resolución con tres grupos monofiléticos, uno para 14 cepas que se agrupan con *F. oxysporum* (LRE1, LRE2, SAN7, SAN8, ZAM11, ZIR12, ZIR13, ZIR14, TAC15, TAC16, ZIR19, ZIH21, ZIH22 y ZIH23), los otros dos grupo para las secuencias tomadas como referencia en el GenBank que comparten el carácter de hifas enrolladas (*F. circinatum*, *F. pseudocircinatum*, *F. steririlihyphosum*, *F. subglutinans* y *F. mexicanum*). Y las cepas LRE3, TAN4, TAN5, TAN6, SAN9, ZAM10, TIR17, TIR18 y ZIH20 no amplificaron con CaM (Figuras 11 y 12).

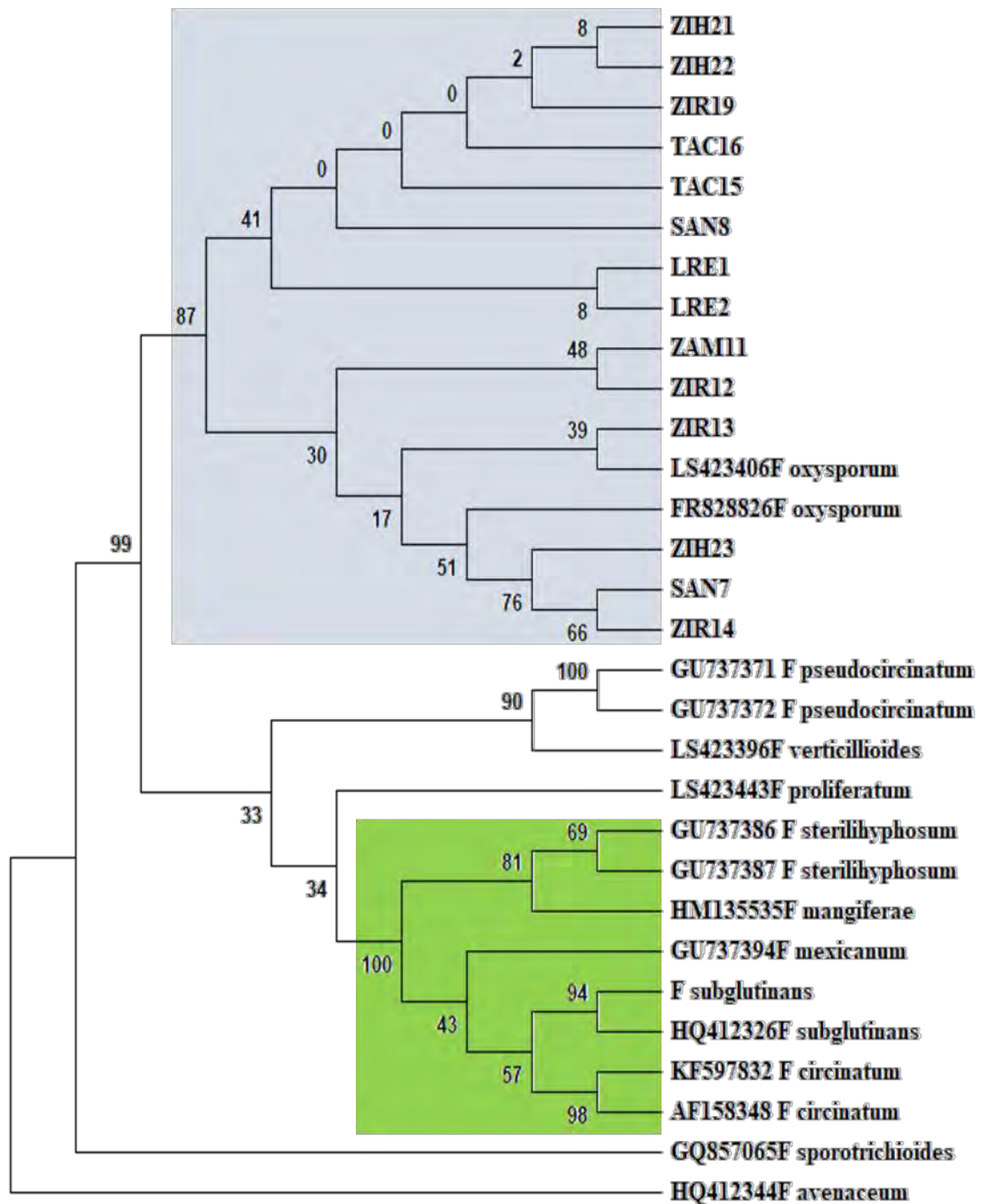


Figura 11. Árbol de distancia derivado de secuencias parciales de CaM obtenidas de cepas del género *Fusarium*, se construyó con el método Maxima Verosimilitud y el modelo de sustitución Kimura 2-parametros con distribución gamma (K2+G) con 1000 repeticiones en sbootstrap y 412 caracteres. El árbol inicial para la búsqueda heurística se obtuvo automáticamente aplicando algoritmos neighbor-join (NJ).

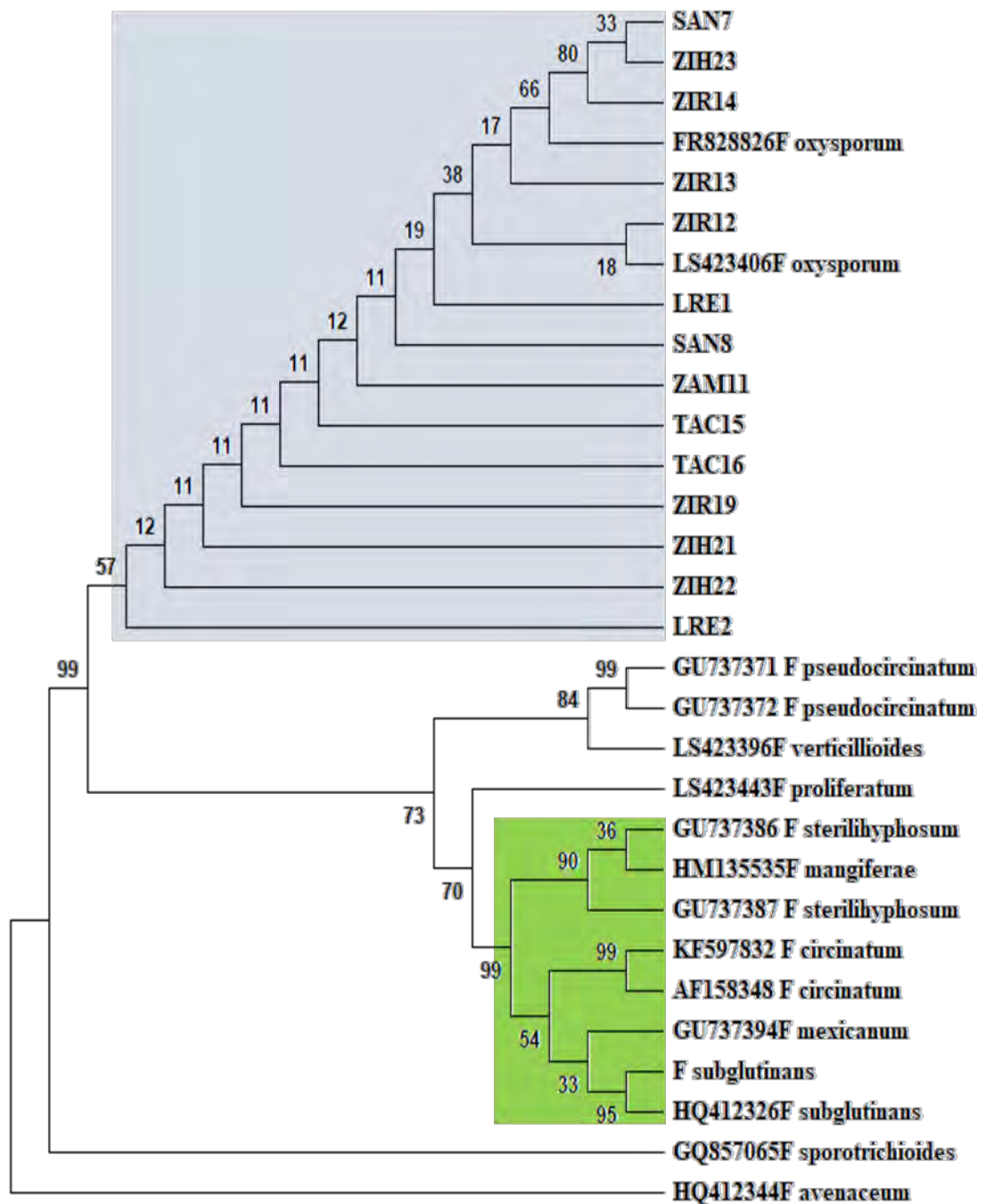


Figura 12. Árbol de distancia derivado de secuencias parciales de CaM obtenidas de cepas del género *Fusarium*, se construyó con el método Maxima Parsimonia y el modelo de sustitución Kimura 2-parametros con distribución gamma (K2+G) con 1000 repeticiones en sbootstrap y 412 caracteres. El árbol inicial para la búsqueda heurística se obtuvo automáticamente aplicando algoritmos neighbor-join (NJ).

Factor de elongación (EF-1 α)

El análisis filogenético de la región codificante para EF-1 α se realizó con base a 676 caracteres y un modelo de sustitución Tamura-Nei (TN) el árbol producto del análisis de máxima verosimilitud y máxima parsimonia presentaron una resolución igual con 8 grupos monofiléticos. Donde dos grupos fueron para *F. oxysporum* con las cepas (LRE2, SAN7, SAN8, ZIR14, TAC15, TAC16, ZIH22 y ZIH23). Un grupo para *F. oxysporum* f. sp. *opuntiarum* que agrupo a la cepa SAN9, un grupo formado por *F. oxysporum* f. sp. *fragariae*, con las cepas (LRE1, ZIR12, ZIR13 y ZIH21). Un grupo con *Fusarium subglutinans* con las cepas (LRE3, TAN4, TAN5, ZAM10, ZAM11, TIR17, TIR18, ZIR19 y ZIH20), los tres grupo restantes fueron para las secuencias tomadas como referencia en el GenBank que comparten el carácter de hifas enrolladas (*F. circinatum*, *F. pseudocircinatum*, *F. sterilihyphosum* y *F. mexicanum*), con este gen no amplificó la cepa TAN6 (Figuras 13 y 14)

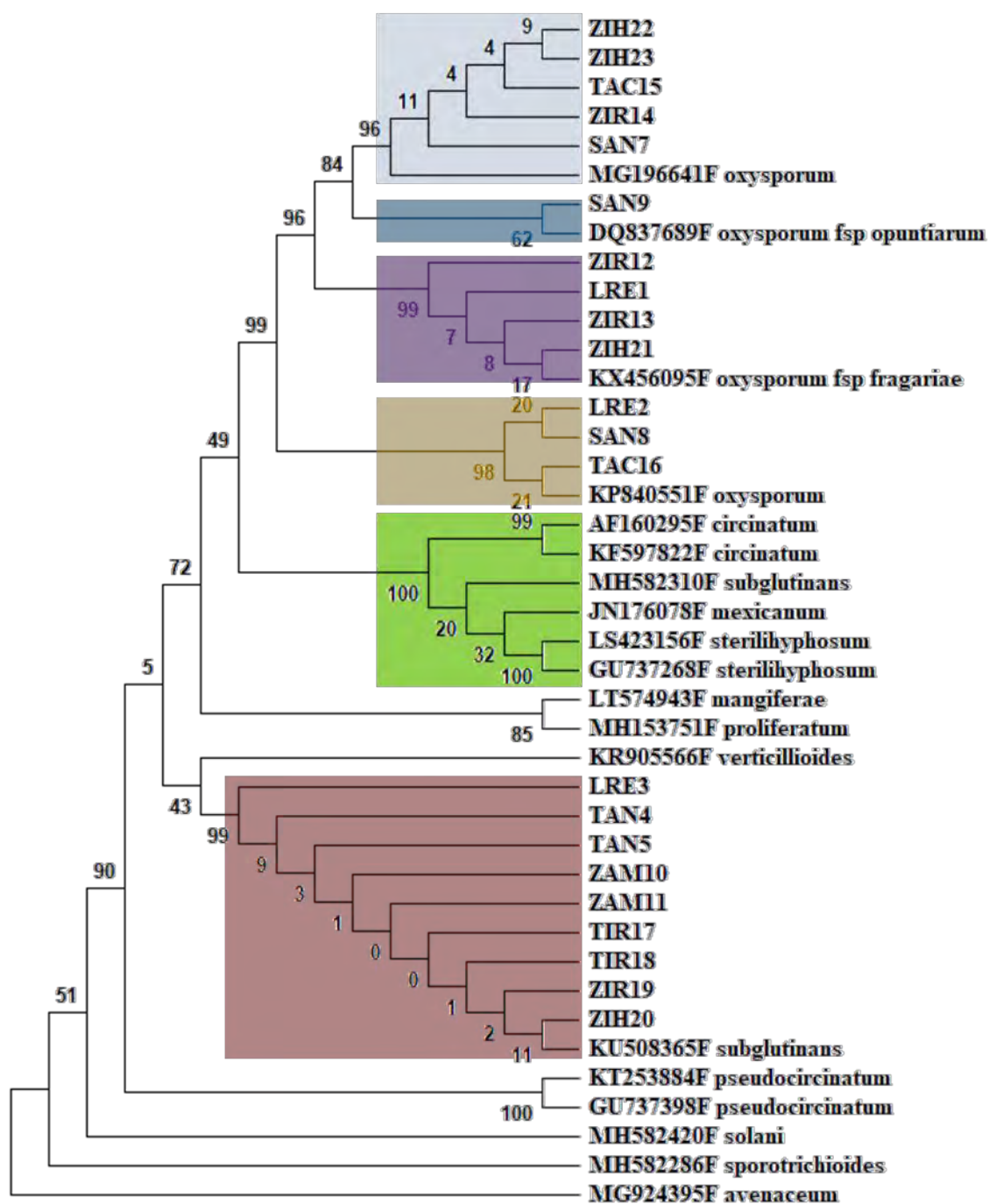


Figura 13. Árbol de distancia derivado de secuencias parciales del género *Fusarium* codificantes para EF-1 α , se construyó con el método Máxima Verosimilitud y el modelo de sustitución Tamura-Nei con distribución gamma (TN93+G) con 1000 repeticiones en bootstrap y 676 caracteres. El árbol inicial para la búsqueda heurística se obtuvo automáticamente aplicando algoritmos neighbor-join (NJ).

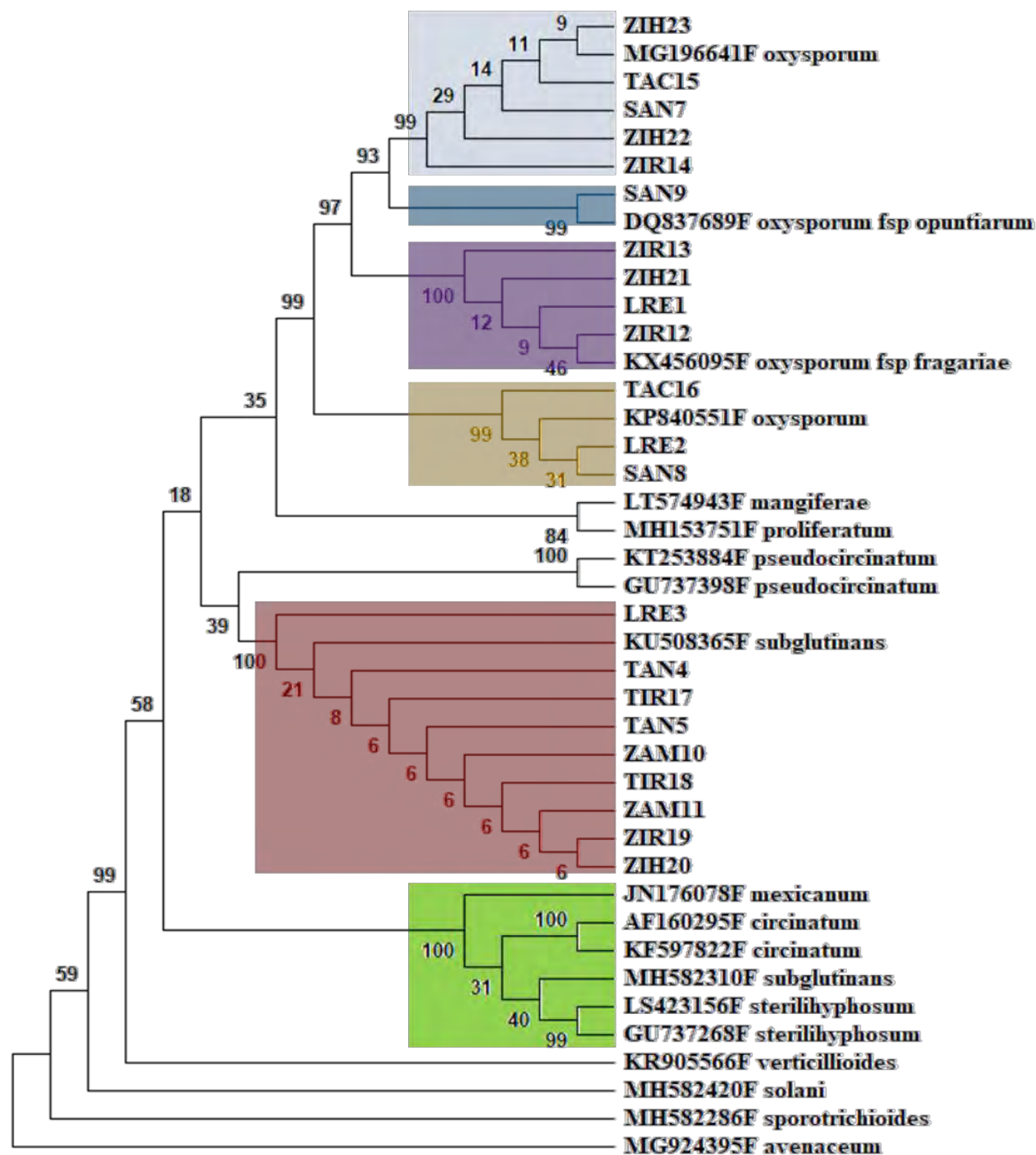


Figura 14. Árbol de distancia derivado de secuencias parciales del género *Fusarium* codificantes para EF-1α se construyó con el método Máxima Parsimonia y el modelo de sustitución Tamura-Nei con distribución gamma (TN93+G) con 1000 repeticiones en bootstrap y 676 caracteres. El árbol inicial para la búsqueda heurística se obtuvo automáticamente aplicando algoritmos neighbor-join (NJ).

El análisis filogenético de arreglos concatenados a partir de secuencias de ADN de multilocus conservados ITS1 y 4 (rDNA), H3, CaM y EF-1 α se realizó con base a 2047 caracteres y un modelo de sustitución General Time Reversible (GTR), el árbol producto del análisis de máxima verosimilitud presento una resolución de ocho grupos monofiléticos, uno para *F. subglutinans* (LRE3, TAN4, TAN5, TAN6, ZAM10, ZAM11, TIR17, TIR18, ZIR19 y ZIH20), dos para *F. oxysporum* (LRE2, SAN8, ZIR14, TAC15, TAC16, ZIH22 y ZIH23) uno para *F. oxysporum* f. sp. *Fragariae* (LRE1, ZIR12, ZIR13 y ZIH21) uno más para *F. oxysporum* f. sp. *opuntiarum* (SAN9) y dos de ellos para las secuencias tomadas como referencia del GenBank por compartir el carácter de hifas enrolladas (*F. circinatum*, *F. pseudocircinatum*, *F. steririlihyphosum*, y *F. mexicanum*) y otro mas formado por *F. solani* y *F. sporotrichioides* que tampoco se agruparon con ninguna cepa de este estudio (Figura 15).

El árbol para Máxima Parsimonia mostró una topología con siete grupos monofiléticos en total, uno para *F. subglutinans* que agrupo a las cepas (LRE3, TAN4, TAN5, TAN6, ZAM10, ZAM11, TIR17, TIR18, ZIR19 y ZIH20) dos para *F. oxysporum* que incluyo las cepas (LRE2, SAN8, ZIR14, TAC15, TAC16, ZIH22 y ZIH23), otro para *F. oxysporum* f. sp. *Fragariae* las cepas que se agrupan en esta especie son (LRE1, ZIR12, ZIR13 y ZIH21) uno mas para *F. oxysporum* f. sp. *opuntiarum* con las cepas (SAN7 y SAN9) dos grupos para las secuencias tomadas del GenBank como referencia y que comparten el carácter de hifa enrollada (*F. circinatum*, *F. pseudocircinatum*, *F. steririlihyphosum*, y *F. mexicanum*) (Figura 16).

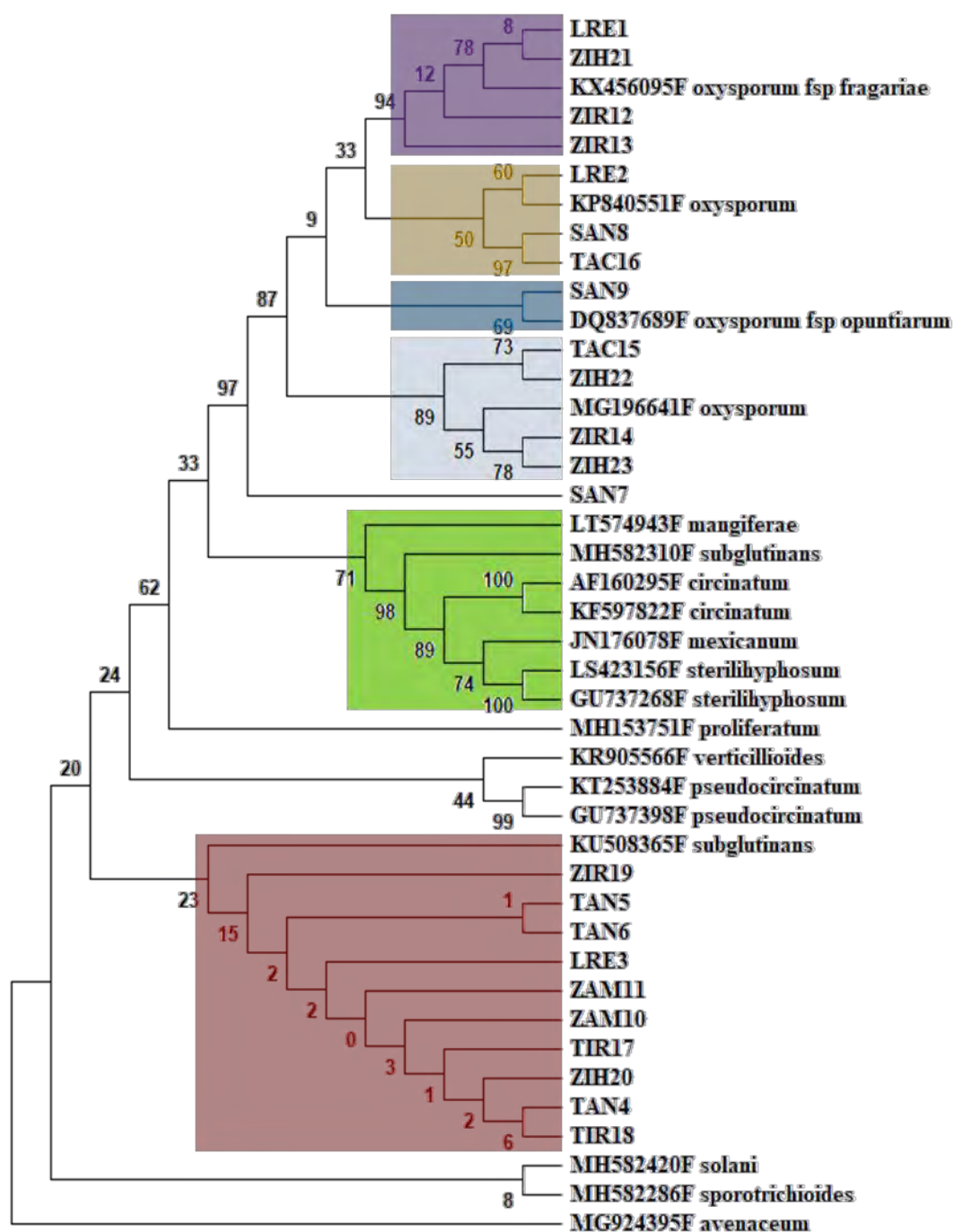


Figura 15. Árbol de distancia derivado de la combinación de secuencias parciales de los genes ITS1 y 4 (rDNA), H3, CaM y EF-1 α , obtenidas de cepas del genero *Fusarium*, se construyó con el método Máxima Verosimilitud y el modelo de sustitución General Time Reversible con distribución gamma (GTR+G) con 1000 repeticiones en bootstrap y 2047 caracteres. El árbol inicial para la búsqueda heurística se obtuvo automáticamente aplicando algoritmos neighbor-join (NJ).

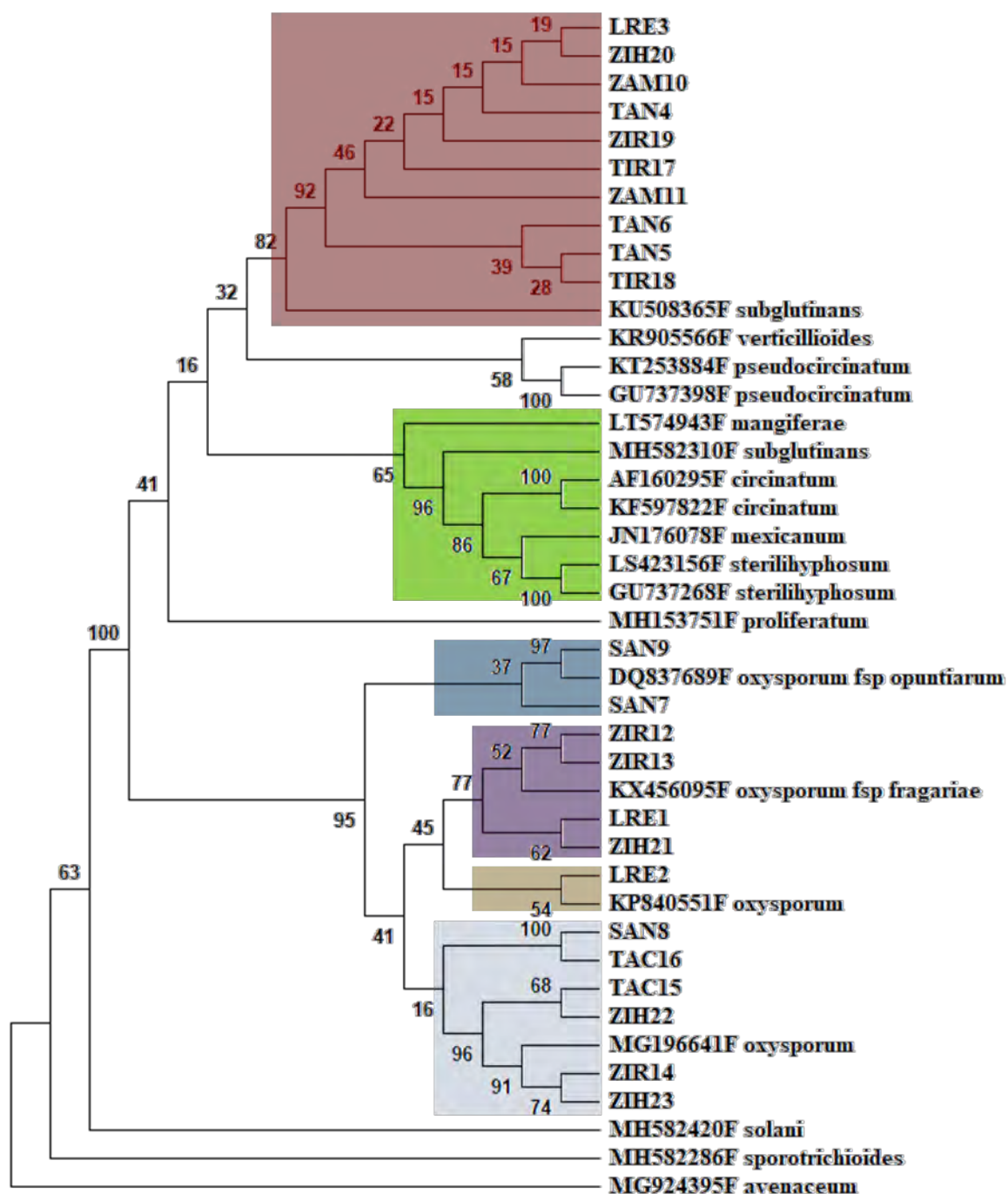


Figura 16. Árbol de distancia derivado de la combinación de secuencias parciales de los genes ITS1 y 4 (rDNA), H3, CaM y EF-1 α , obtenidas de cepas del genero *Fusarium* se construyó con el método Máxima Parsimonia y el modelo de sustitución General Time Reversible con distribución gamma (GTR+G) con 1000 repeticiones en bootstrap y 2047 caracteres. El árbol inicial para la búsqueda heurística se obtuvo automáticamente aplicando algoritmos neighbor-join (NJ).

El análisis filogenético a partir de secuencias de ADN de multilocus conservados ITS1 y 4 (rDNA), H3, CaM y EF-1 α fue diferente para cada primers. La región ITS1 y 4 (rDNA) han sido utilizados ampliamente para solucionar las relaciones taxonómicas a nivel de especie (Alves-Santos *et al.*, 2002), el árbol resuelto por esta región, tuvo una topología consistente entre ellos, sin embargo difiere al resto de los árboles resueltos por los otros genes ya que solo incluye a *F. oxysporum* y a *F. verticillioides* (Figura 8). Estos resultados son similares a los reportados por Ochoa *et al.* (2012), Salazar-González *et al.* (2016) Moreno *et al.* (2005) Pérez *et al.* (2005) quienes identificaron a *F. oxysporum* y *F. verticillioides*, usando esta región. Sin embargo difieren de los de Leyva-Mir *et al.* (2017), y quienes mencionan que esta región ITS del ADN ribosomal es universal por lo que no es suficiente para identificar adecuadamente las especies del género *Fusarium*.

El EF-1 α fue el que presentó una mejor resolución para las cepas de este estudio, coincide con Gupta *et al.*, (2011); Watanabe *et al.*, (2011) y Madania *et al.*, (2013), quienes manifiestan que los análisis filogenéticos realizados con base a marcadores codificantes para proteínas y en especial la región para la que codifica factor de elongación, tiene una resolución superior a otros iniciadores como ITS, H3 y CaM. Es altamente informativo a nivel de especie del género *Fusarium*, debido al alto nivel de secuencias polimórficas que muestran entre especies estrechamente relacionadas; ya que codifica una parte esencial de las proteínas involucradas en la maquinaria de traducción (O'Donnell *et al.*, 1998; Geiser *et al.*, 2004; Steenkamp *et al.* (2002; Leyva-Mir *et al.*, 2016).

Se han hecho investigaciones similares a la nuestra con buenos resultados con este primers como; en trigo se identificaron, *F. oxysporum*, *F. verticillioides* y *F. proliferatum*, (Leyva-Mir *et al.*, 2017), en banano *F. verticillioides* con una identidad de 100 % (Hirata *et al.*, 2001), en maíz *F. verticillioides*, *F. nygamai*, *F. andiyazi* y *F. thapsinum* (Leyva-Madrigal *et al.*, 2014), en escoba de bruja de mango, *F. mexicanum* (Betancourt *et al.*, 2012). En aislados asociados a la pudrición basal del fruto de pitahaya, *F. oxysporum*, (Salazar-González *et al.*, 2016), en la raíz aguacate *F. oxysporum* y *F. solani* (Olalde, 2016).

De acuerdo con estos resultados revela que primers usados, ITS1 y 4 (rDNA), H3, CaM y EF-1 α). El árbol de distancia basado en secuencias parciales del gen EF-1 α fue consistente tuvo la mayor resolución permitió la identificación todos los aislamientos, con las siguientes especies del género *Fusarium*; *F. subglutinans*, *F. oxysporum*, *F. oxysporum* f. sp. *fragariae* y *F. oxysporum* f. sp. *opuntiarum*. Esto no fue posible con los demás primers, el análisis de

concatenación reafirma que EF-1 α muestra una resolución superior en comparación con los demás genes probados, (Kvas *et al.*, 2009; Dal Prà *et al.*, 2010; Wulff *et al.* 2010; O'Donnell *et al.*, 1998; Geiser *et al.*, 2004). Resultados que coinciden con los obtenidos por Leyva-Madrigal *et al.* (2014), mencionan que el análisis de concatenación (CaMA + EF-1 α) mejora el soporte de arranque del árbol.

Actualmente EF-1 α es más utilizado para la identificación a nivel de especie en el género *Fusarium*, sin embargo otras regiones también estudiadas con este mismo fin incluyen genes de apareamiento (MAT), genes que codifican para la Celobiosa-C y la Topoisomerasa II, el gen que codifica para la β -tubulina entre otros (Atkins y Clark, 2004; Hatsch *et al.*, 2004; Hinojo *et al.*, 2004; Wil *et al.*, 2004; Bogale *et al.*, 2006; Dyavaiah *et al.*, 2007; Alustre-Izquierdo *et al.*, 2008), se ha demostrado la poca utilidad de las regiones ribosomales para la identificación del género *Fusarium* a nivel especie por ser demasiado conservadas y por ende tienen menor capacidad de resolución lo que ha generado filogenia errónea de poca confiabilidad en el proceso de identificación (Sakai *et al.*, 2006; Dyavaiah *et al.*, 2007; Zaccardelli *et al.*, 2008). En esta investigación con EF-1 α permitio identificar las cepas obtenidas de pudrición de raíz de arándano en dos especies (*F. subglutinans*, *F. oxysporum*, *F. oxysporum* f. sp. *fragariae* y *F. oxysporum* f. sp. *opuntiarum*) las cuales no habían sido reportadas en arándano.

Hifas enrolladas

La caracterización molecular y el análisis filogenético de las secuencias amplificadas con los diferentes primers usados en esta investigación determinaron que los aislados con el carácter de hifas enrolladas se identificaron en las especie de; *F. subglutinans* con las cepas LRE3, y TAN4, *F. oxysporum* con SAN7, ZIR14 y TAC16, y en *F. oxysporum* f. sp. *opuntiarum* la cepa SAN9, característica no reportada para estas especies (Leslie y Summerell, 2006), sin embargo Zheng y Ploetz (2002) reportan a *F. subglutinans* obtenido de malformación de la inflorescencia de mango, con esta característica morfológica de hifas enrolladas.

4.5 Caracterización patogénica

Las pruebas patogénicas en plantas permiten demostrar la relación planta-fitopatógeno. La concentración de conidios en las soluciones de inóculo fue de acuerdo a la cepa, se usaron cepas de 72 h crecidas en medio nutritivo PDA (Cuadro 2).

Cuadro 3. Concentración de conidios, virulencia y severidad de la enfermedad de 23 cepas de *Fusarium* spp.

Clave	Concentración (conidios/mL)	Virulencia (Días)	Severidad de la enfermedad
LRE1	39,300	43.2	Flacidez de las hojas
LRE2	53,800	41.8	Amarillamiento
LRE3	65,300	41.8	Amarillamiento
TAN4	36,400	39.8	Amarillamiento
TAN5	39,600	39.4	Muerte de la planta
TAN6	31,600	40.6	Amarillamiento
SAN7	27,900	39.2	Apices muertos
SAN8	160,400	38.2	Amarillamiento
SAN9	23,600	41	Apices muertos
ZAM10	160,000	39.4	Apices muertos
ZAM11	12,200	40.6	Amarillamiento
ZIR12	20,600	40.8	Apices muertos
ZIR13	35,400	41.4	Flacidez de las hojas
ZIR14	18,000	42.6	Flacidez de las hojas
TAC15	49,200	42.2	Amarillamiento
TAC16	133,400	43	Amarillamiento
TIR17	67,600	40.8	Apices muertos
TIR18	51,400	39.6	Apices muertos
ZIR19	62,000	40.8	Apices muertos
ZIH20	86,000	41	Amarillamiento
ZIH21	61,600	39.4	Amarillamiento
ZIH22	78,000	40.2	Flacidez de las hojas
ZIH23	132,200	38.2	Amarillamiento
TESTIGO	0	-	Planta sana

Los síntomas que se presentaron en invernadero fueron similares a los observados en campo, las plantas comenzaron a adquirir una coloración plateada en el haz de las hojas maduras, en las hojas jóvenes como en los retoños se presentó una coloración rojiza o blanquecina, también hubo un amarillamiento en toda la planta o en algunos casos solo en ramas (Figura 17).

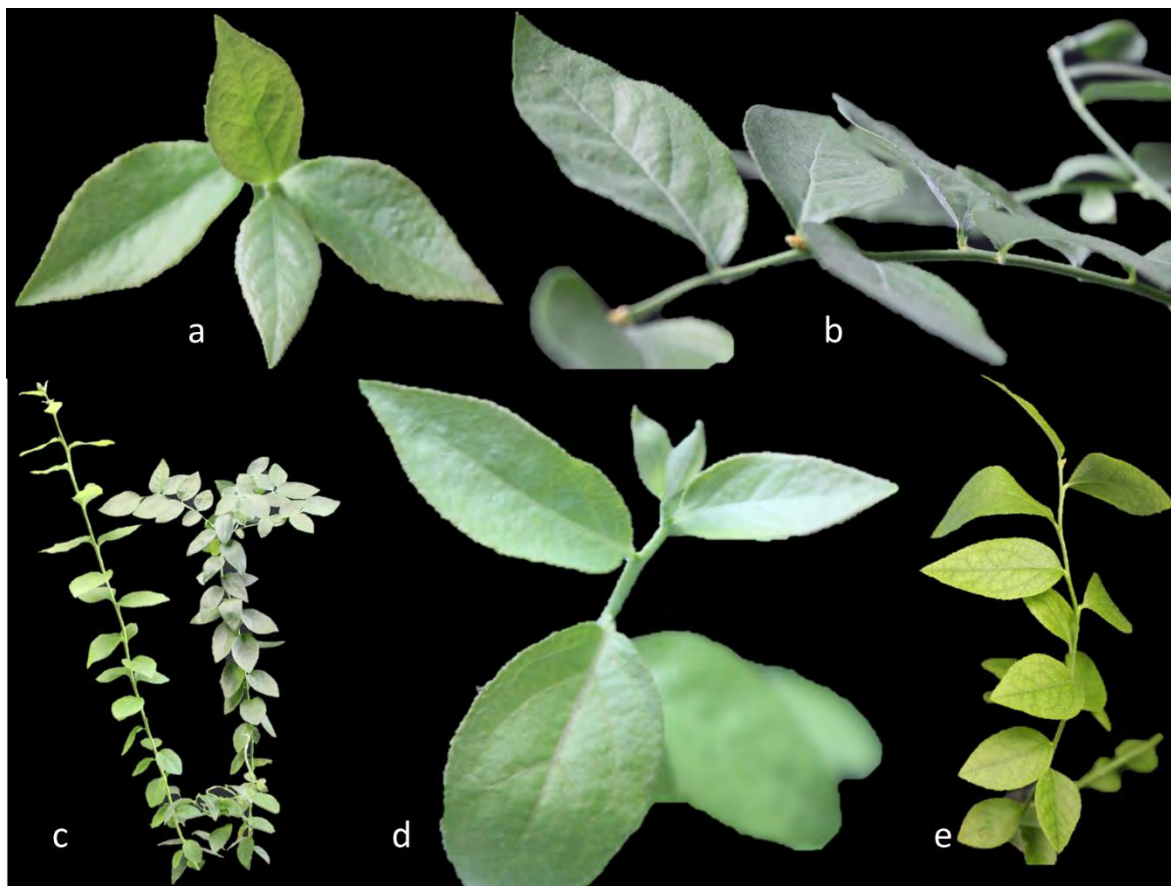


Figura 17. Síntomas iniciales observados en plantas de arándano: a) retoños blanquecinos, b) hojas maduras color plateadas, c) parte de la planta presenta color plateado, d) retoños rojizo-blanquecino, e) amarillamiento uniforme de ramas.

4.5.1. Virulencia de las cepas de *Fusarium* spp.

La virulencia de las cepas se presentó de manera homogénea estadísticamente, sin diferencia significativa, donde de las 23 cepas inoculadas a las plantas de arándano fueron virulentas, las cepas SAN8 y ZHI23 presentaron más rápido los síntomas de flacidez, amarillamiento y deformación de hojas, esto fue a los 38 días después de haber sido inoculado, solo la cepa TAN5 presentó el grado IV que muestra muerte de alguna de sus ramas de acuerdo a la escala de Lara (2008) a los 39 días de haber sido inoculada. La cepa LRE1 y TAC16 necesitaron más tiempo que el resto de las cepas para producir síntomas en plantas de arándano y fue a los 43 días de haber sido inoculadas (Figura 18).

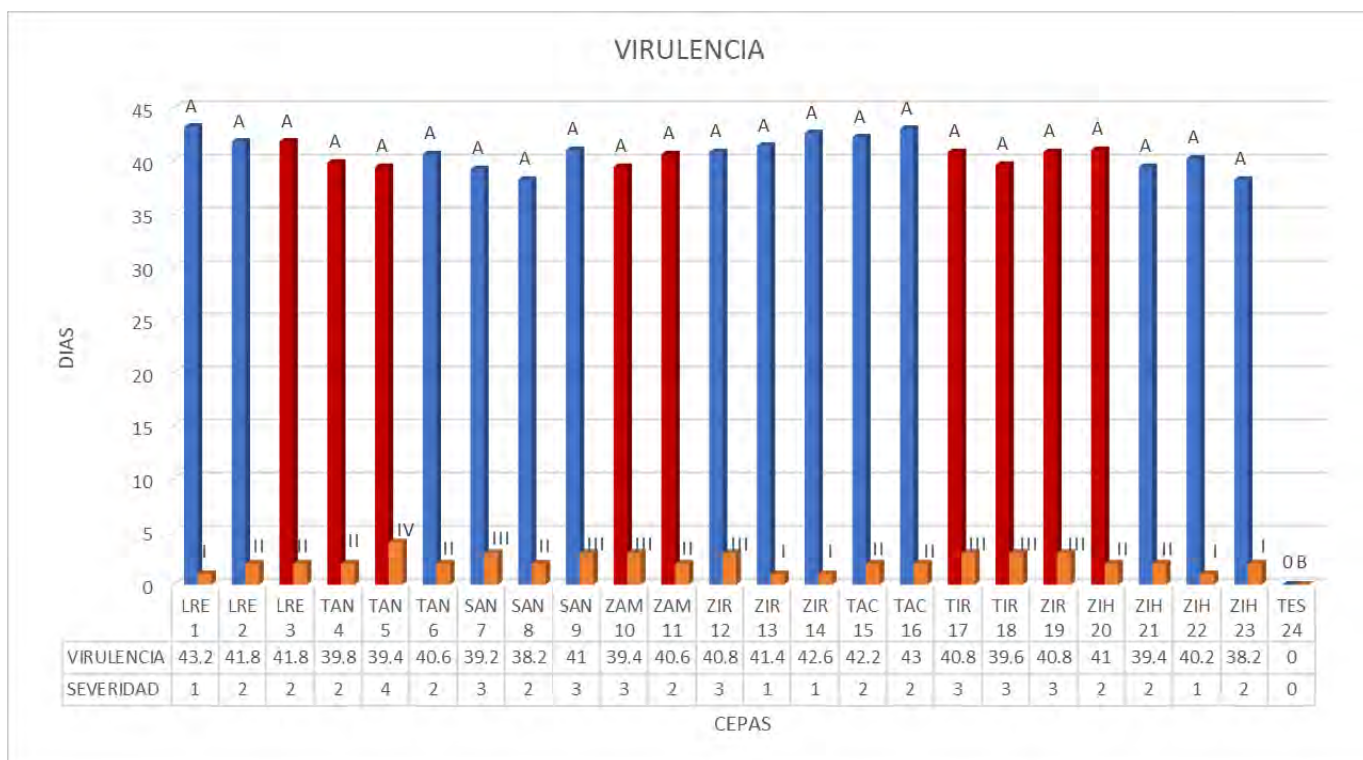


Figura 18. Severidad y virulencia de 23 cepas de *Fusarium* spp., inoculadas a plantas de arándano.

4.5.2. Severidad de la enfermedad de las cepas inoculadas en plantas de arándano

La severidad de la enfermedad determinada en las plantas de arándano, inoculada con cada una de las 23 cepas, indicó que existe variabilidad de acuerdo con la escala de Lara (2008) en los cuatro grados de enfermedad producida. La cepa TAN5 presentó una capacidad para producir la muerte de las plantas a los 39 días posteriores a la inoculación (grado IV) (Figuras 19 y 23). El 31 % de las cepas inoculadas en plantas de arándano provocaron una severidad menor con respecto a la cepa anterior, los síntomas que presentaron fueron: hojas y puntas de las ramas secas color café a marrón, grado III, en la escala de Lara (2008), las cepas que presentaron este síntoma fueron: SAN7, SAN 9, ZAM10, ZIR12, TIR17, TIR18 y ZIR19 (Figuras 20 y 23). Un tercer grupo ocasionó menor severidad, los síntomas observados fueron; hojas amarillas y algunas con el borde seco y enrollamiento de los bordes paralelos a la nervadura primaria hacia el centro de la hoja (grado II) en la escala de Lara (2008), las cepas que produjeron este síntoma fueron LRE2, LRE3, TAN4, TAN6, SAN8, ZAM11, TAC15, TAC16 y ZIH20, las cuales representan el 48 % del total de las cepas (Figuras 21 y 23). Finalmente un cuarto grupo conformado con las cepas LRE1, ZIR13 y ZIR14, las

plantas presentaron; flacidez, necrosis en las puntas o amarillamiento de algunas de las hojas de las plantas de arándano (grado I) en la escala de Lara (2008) (Figuras 22 y 23).



Figura 19. Síntoma de muerte (grado IV en la escala de Lara, 2008): a) Planta completa con rama muerta. b) Rama muerta.

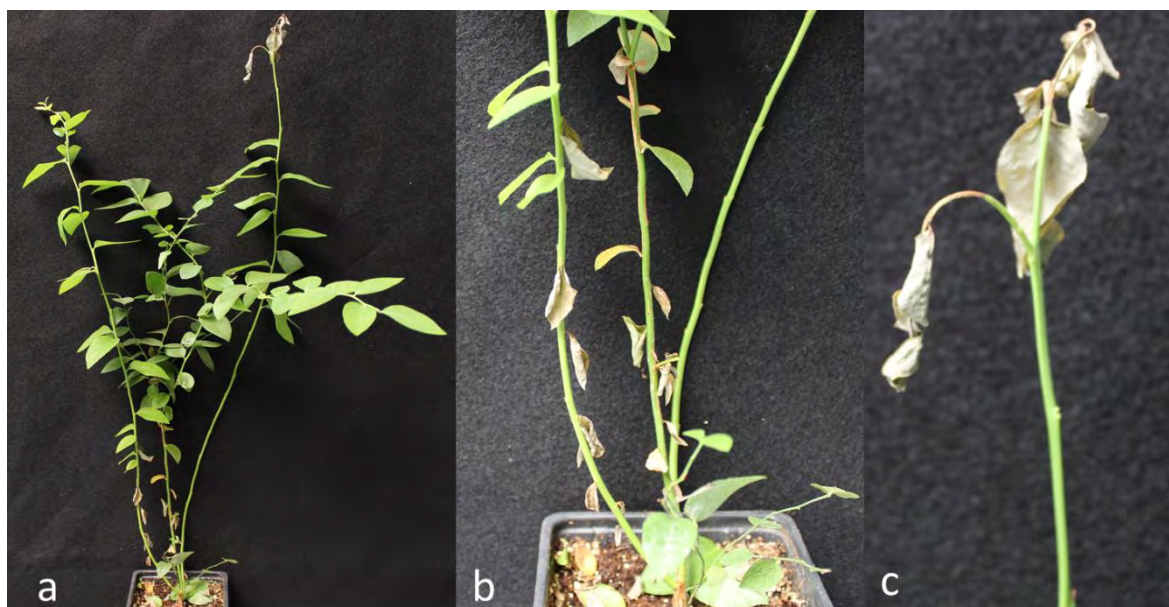


Figura 20. Síntomas de la planta con el grado III en la escala de Lara (2008): a) Planta completa con ápice muerto. b) Hojas secas de la parte media de la planta. c) Ápice de las ramas muertas.



Figura 21. Síntomas que presentaron con el grado II en la escala de Lara (2008): a) Planta completa amarilla. b) Hojas amarillas. c) Enrollamiento de los bordes hacia el centro de la hoja.



Figura 22. Grado I en la escala de Lara (2008): a) Planta completa. b) Flacidez. c) Necrosis en el ápice de las hojas. d) Amarillamiento de hojas poco marcado.



Figura 23. Porcentaje de cepas de *Fusarium* spp., aisladas de raíz de arándano agrupadas por cada grado de severidad de la enfermedad de acuerdo a la escala de Lara (2008).

Éstos síntomas coinciden con los reportados por Koyyappurath *et al.* (2015) y Gaetán *et al.* (2007), quienes observaron que *Fusarium oxysporum* ocasionó decaimiento general, clorosis y necrosis en los tallos de espárrago. Por otra parte, Tomoika *et al.* (2011) reportan que *F. solani* en lisianthus (*Eustoma grandiflorum*), produjo además de marchitez, defoliación y posterior muerte de la planta. Figueroa-Rivera *et al.*, (2010) mencionan que de un conjunto de especies de *Fusarium* aisladas de maíz, *F. subglutinans* y *F. verticillioides*, fueron las más patógenas y produjeron síntomas similares a los observados en este estudio al inicio. Kenneth *et al.* (2018), al inocular *F. oxysporum* en plantas de apio, observaron a los 30 días senescencia y marchitez en las plantas tratadas, los daños fueron más severos a los 35 días y provocó la muerte de las plantas. Holalde (2018) al inocular plántulas de aguacate con *F. oxysporum* y *F. solania* observó variación en los síntomas en cuanto al tiempo, pero todas las plantas inoculadas con ambas especies produjeron síntomas, amarillamiento marchitez y necrosis en la parte aérea de las plantas. El tiempo que tardan las especies de *Fusarium* en provocar los síntomas variaron de acuerdo a los observados en este estudio.

V. CONCLUSIONES

Con base en los objetivos e hipótesis planteadas y procedimientos aplicados en la presente investigación, se concluye lo siguiente:

Las especies de *Fusarium* spp., aisladas de raíz de arandano presentaron variación morfológica.

Mediante la combinación de características morfológicas y moleculares, se identificó a *F. oxysporum*, *F. oxysporum* f. sp. *fragariae* y *F. subglutinans*, *F. subglutinans* f. sp. *opuntiarum* como especies causantes del síntoma de pudrición de raíz en plantas de arándano en la zona productora del estado de Michoacán, México.

El iniciador que codifica para EF-1 α , presentó una resolución superior a los iniciadores que codifican para ITS rDNA, CaM y H3 en especies de *Fusarium*.

Todas cepas fueron patogénicas al ser inoculadas en plantas de arándano, varió su virulencia y la severidad de la enfermedad.

VI. LITERATURA CITADA

- Agrios, G. N., 2005.** Plant Pathology 5th edition. Elsevier. United States of America. 922 p.
- Alves-Santos, F. M., Cordeiro-Rodríguez, L., Sayagues, J. M., Martín-Domínguez R., García-Benavides, P., Crespo, M. C. C., Díaz-Míguez, M., and Eslava, A. P., 2002.** Pathogenicity and race characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* isolates from Spain and Greece. Plant. Pathol. 51: 605-611.
- Anderson, N. A., 1982.** The genetics and pathology of *Rhizoctonia solani*. Ann Rev Phytopathol 20: 329-347.
- Andy, Vierstraete., 1999.** <https://users.ugent.be/~avierstr/index.html> Accesada 2 de junio de 2019.
- Aoki, T., O'Donnell, K., Geiser, D. M., 2014.** Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: Current status and future challenges. J. Gen Plant Pathol 80: 189-201 pp.
- Atkis, S., y Clark, I., 2004.** Fungal Molecular diagnostics. A mini review. Journal of applied Genetics 45: 3-15.
- Ávila, V. T., 2009.** Caracterización de aislamientos de *Fusarium* spp., asociados con malformación de mango en Michoacán. Tesis de maestría en ciencias. UMSNH. 73p.
- Bañados M., 2006.** Blueberry Production in South America. Acta Hort. 715: 165-172.
- Bañados, M. P., 2009.** Expanding blueberry production into non-traditional production areas: northern Chile and Argentina, Mexico and Spain. Proc. IXth IS on *Vaccinium*. (eds): K.E. Hummer. ISHS. Acta Hort. 810 p.
- Baayen, R. P., Van E. C., y Elgersma, D. M., 1985.** Colonization and histopathology of susceptible and resistant carnation cultivars infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *Dianthi*. Netherlands Journal of Plant Pathology. 91: 119 - 135.
- Baayen, R. P., O'Donnell, K., Bonants, P. J. M., Cigelnik, E. K. L., Roebroek, E., Waalwijk, C., 2000.** Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic formae speciales causing wilt and rot disease. Phytopathology. 90: 891-900.
- Bailey, B. A., Hebbar, K. P., Darlington, C. C., Connick, W. J., y Daigle, D. J. Jr., 1998.** Formulations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *erythroxyli* for biocontrol of *Erythroxylum coca* var. *coca*. Weed Sci. 46: 682-689.
- Barile, T. V., y Esguerra, E. B., 1984.** Low temperature storage of yeam beans. Department of Horticulture, University of Philippines, Los Baños. Postharvest Research Notes 1:5-23.

- Betancourt, I., Velázquez, M. J. J., Montero, C. J. C., Fernández, P. S. P., Lozoya, S. H., y Rodríguez, A. G., 2012.** *Fusarium mexicanum* Agente Causal de la Malformación del Mango en Jalisco, México. *Revista Mexicana de fitopatología* 30: 115-127.
- Bhat, R., Ravishankar, V. R., Karim, A. A., 2009.** Mycotoxins in food and feed: present status and future concerns. *Compr Rev Food Sci Food Saf*): 57-81 pp.
- Booth, C., 1986.** The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Reino Unido. 237 p.
- Booth, C. L., 1975.** The present status of *Fusarium* taxonomy. *Annual review of phytopathology*. 13: 83-93.
- Boot C. L., 1971.** The genus *Fusarium*. CMI. Kew. Surrey.
- Bristow, P. R., and Milholland, R. D., 1995.** Botrytis blight. pp. 8-9. *In*: F. Caruso and D.C. Ramsdell (eds.). *Compendium of blueberry and cranberry diseases*. APS Press, St. Paul, Minn., USA. 87 p. Bristow, P.R., and Strech, A.W. 1995.
- Britz, H. E. T., Steenkamp, T. A., Coutinho, B. D., Wingfield, W. F. O., Marasas, W. F. O., and Wingfield. M. F., 2002.** Two new species of *Fusarium* section *Liseola* associated with mango malformation. *Mycology* 94: 722-730.
- Caballero, J. L., Valpuesta, V., y Muñoz Blanco, J. M., 2001.** *Introducción a la Biotecnología Vegetal: Métodos y aplicaciones*. Publicaciones CajaSur. Córdoba. 406 p.
- Caruso, F., Ramsdell, L., 2007.** *Compendium de blueberry and cranberry diseases*. Ed. APS PRESS. st. Paul, MN. 87 p.
- Castillo, M., y Ferris, I., 2005.** Efecto de la aplicación de *Trichoderma viride*, *Gliocadium virens* y vermicompost sobre el hongo patógeno *Fusarium* sp., aislado a partir de plantas de melón. Tesis de licenciatura. Facultad de Microbiología, Universidad de Costa rica. San José, Costa Rica. 45 p.
- Cisternas, E., y France, A., 2009.** *Manual de campo. Plagas, enfermedades y desordenes fisiológicos del arándano en Chile*. Boletín, INIA N°189. 127 p. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Chillan, Chile.
- Cline, W. O., and Schilder, A., 2006.** Identification and control of blueberry diseases. pp. 115-138. *In*: N.F. Childers and P.M. Lyrene, (eds.). *Blueberries for growers, gardeners, and promoters*. dr. Norman F. Childers Publications, Melrose, Florida, USA. 266 p
- Cobelo, L., 2004.** El príncipe azul entre los berries suplemento Rural, diario Clarín.
- Cuniberti, M., 2001.** *Fusarium* vs calidad de trigo. <http://www.redagraria.com/divulgación>. <http://www.redagraria.com/divulgaci%F3n%20t%E9cnica/articulos%20de%20dt/fusarium%20vs%20calidad%20trigo.html>. Accesado, octubre 2018.

- Dal Prà, M., Tonti, S., Pancaldi, D., Nipoti, I., 2010.** First report of *Fusarium andiyazi* associated with rice bakanae in Italy. *Plant Dis.* 94: 1070.
- Darnell, R. L., 1991.** Photoperiod, carbon partitioning, and reproductive development in rabbiteye blueberry. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 116:856-860.
- Dyavaiah, M., Ramani, R., Chu, D., Ritterband, D., Shah, M., Samsonoff, W., Chaturvedi, S., Chaturvedi, V., 2007.** Molecular characterization, biofilm analysis and experimental biofouling study of *Fusarium* isolates form recent cases of fungal keratitis in New York State *BMC Ophthalmology* 7: 1.
- Díaz de Castro, F. J., Restrepo, M. A., Rojas, W., 2007.** *Microbiología de las Infecciones Humanas. Primera Edición. Corporación para Investigaciones Biológicas. Medellín, Colombia.*
- Doyle J. J., y Doyle J. L., 1990.** Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus.* 12:13–15.
- Edwards, S., O’Callaghan, J., Dobson, A. D. W., 2002.** PCR-Based detection and quantification of mycotoxigenic fungi. *Mycological research* 106: 1005-1025.
- Figuroa-Rivera, M. G., Rodriguez-Guerra, R., Guerrero-Aguilar, B. Z., González-Chavira, M. M., Pons-Hernández, J. L., 2010.** Caracterización de especies de *Fusarium* asociadas a la pudrición de raíz de maíz en Guanajuato, México. *Revista Mexicana de Fitopatología.* 28: 124-134.
- FAOSTAT. 2016.** http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/commodities_by_country Accesada 24 de noviembre de 2018.
- Finn, C., Olmstead J., Hancock, J., Brazelton, D., 2014.** Welcome to the Party! Blueberry Breeding Mixes Private and Public with Traditional and Molecular to Create a Vibrant New Cocktail. *Acta Hort.* 1017:51-61.
- Gaetan, S. A., Madia, M. S., Perez, A., 2007.** Recent outbreak of *Fusarium* Crown an root rot caused by *Fusarium solani* in marjoram in Argentina. *Australian Plant Disease Notes.* 2: 15-16.
- García, P., 2011.** Evaluación de la tolerancia de cinco accesiones de *Vasconcellea* a *Fusarium* sp., como posible porta injertos para babaco (*Vasconcellea x. heilbornii*) bajo cubierta plástica en la Estación Experimental del Austro del INIAP. Tesis de Magister en Gestión de la Producción de Flores y Frutas Andinas para Exportación. Facultad de Ingeniería Agronómica, Universidad Técnica de Ambato. Ecuador. 74 p.
- Garcés de Granada, E., Orozco de Amézquita, M., Bautista, G. R., y Valencia H., 2001.** *Fusarium oxysporum* el hongo que nos falta conocer. *Acta Biol. Colombiana* 6: 1-20.

- Geiser, D. M., Jiménez-Gasco, M. M., Kang, S., Makalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T. J., Zhang, N., Kuldau, G. A., y O'Donnell, K., 2004.** *Fusarium-ID. 1.0: a DNA sequence database for identifying Fusarium.* Eur J Plant Pathol. 110: 473–479.
- Gerlach, W., and Nirenberg, H., 1982.** The genus *Fusarium*. A. Pictorial atlasd. Mitt. Biol. Bunfrdsndt. Land u, Forstwirtschaft. Berlin-Dahlem. 209: 1-406.
- Glass, N. L., and Donaldson, G. C., 1995.** Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. Applied and Enviromental Microbiology 61: 1323-1330.
- González-Cárdenas, J., Maruri-Garcia, J., and González-Acosta, A., 2005.** Evaluación de diferentes concentraciones de *Trichoderma* spp., contra *Fusarium oxysporum* agente causal de la pudrición de plántulas en papaya (*Carica papaya* L.), en Tuxpan, Veracruz, México. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad Veracruzana, Campus Tuxpan. Revista UDO Agrícola 5 (1): 45-47.
- Gough, R. E., 1994.** The highbush blueberry and its management. The Haworth Press, Inc. Binghamton, NY. 272 p.
- Gouy, G., Guindon, S., and Gascuel, O., 2010.** SeaView Versión 4: A Multiplatform Graphical User Interface for Sequence Alignment and Phylogebetic Tree Building. Mol. Biol. Evol. 27 (2): 221-224.
- Gutiérrez-Contreras, M., Lara-Chávez, Ma, B. N., Guillén-Andrade, H., Chávez-Bárceñas, A. T., 2010.** Agroecología de la franja aguacatera en Michoacán, México. 35: 647-653.
- Hall, T. A., 1999.** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98.
- Hatsch, D., Phalip, V., Jeltsch, J, M., 2004.** Use of genes encoding cellobiohydrotase-C and topoisomerase II as targets for phylogenetic analysis and identification of *Fusarium*. Research in Microbiology. 55: 290-296.
- Hernández, O., 2010.** Detención y caracterización del agente causal del tizón foliar en Teca (*Tectona grandis* L. F.) en Huimanguillo, Tabasco. Tesis de Ingeniero Forestal. Universidad Autónoma Chapingo. México. 63 p.
- Hietala, A. M., Sen R., and Lilja, A., 1994.** Anamorphic and teleomorphic characteristics of a uninucleate *Rhizoctonia* sp. isolated from the roots of nursery grown conifer seedlings. Mycol Res 98: 1044-1050.
- Hinojoso, M., Llorens, A., Mateo, R., Patiño, B., González-Jaén, M., Jimenéz, M., 2004.** Utility of the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of the intergenic

- spacer region of the rDNA for characterizing *Gibberella fujikuroi* isolates. Systematic and Applied Microbiology. 27: 681-688.
- Hirata, T., Kimishima, E., Aoki, T., Nirenberg, H. I., and O'Donnell, K., 2001.** Morphological and molecular characterization of *Fusarium verticillioides* from rotten banana imported into Japan. Myciscience 42: 155-166.
- Howell, A., 2009.** Update on Health Benefits of Cranberry and Blueberry. Acta Hort. 810:779-784.
- Hudson, M. E., 2008.** Sequencing breakthrough for genomic ecology and evolutionary biology. Molecular Ecology Resources. 8: 3-17.
- Knutsen, A. K., Torp, M., and Holst-Jensen, A., 2004.** Phylogenetic analyses of the *Fusarium* *pose*, *Fusarium sporotrichoides* and *Fusarium langsethiae* species complex based on partial sequences of the translation elongation factor-1 alpha gene. International Journal of Food Microbiology. 95: 287-295.
- Kenneth, R., Ramirez-Coche, J. A., Castro, O., Blanco-Meneses, M., 2018.** Caracterización morfológica y molecular de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Apii* asociado a la marchitez del apio en Costa Rica. Agronomía Costa Ricence 42 (1): 115-126.
- Koch, R., 1876.** The etiology of anthrax, based on the life history of bacillus anthracis. Beiträge zur biologie der pflanzen 2(2), 277-310. En: <http://ce.ecn.purdue.edu/~piwc/w3-history/koch/koch-anthrax.html>. Accesada 02 de junio de 2019.
- Kornerup, A., & Wanscher, J. H., 1978.** Methuen Handbook of Colours. 3rd edn. Eyre Methuen, London. Lightner D.V. & Fontaine C.T. 225 p.
- Koyyappurath, S., Atuahiva, T., Le Guen, R., Batina, H., Le Squin, S., Gautheron, N., Edel Hermann V., Peribe, J., Jahiel, M., Steinberg, C., Liew, E. C., Alabouvette, C., Beese, P., Dron, M., Sache, I., Laval, V., Grisoni, M. 2015.** *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-vanillae* is the causal agent of root and stem rot of vainilla. Plant Pathology. 1-14.
- Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K., 2016.** **Mega 7:** Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. Mol. Biol. Evol. 33: 1870-1874.
- Kraft, J., M. Burke, D. W., and Haglund, W. A., 1981.** *Fusarium* diseases of beans, peas, and lentils. In: *Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy* (eds. P. E. Nelson, T. A. Toussoun and R. J. Cook). The Pennsylvania State University Press, University Park: 142-156 pp.
- Lara, Ch. Ma. B. N., 2008.** Variabilidad fenotípica y patogénica de *Phytophthora cinnamomi* Rands en la franja aguacatera de Michoacán, México. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Nayarit, Xalisco, Nayarit, México. 67 p.
- Leslie, J. F., and Summerell, B. A., 2006.** The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing. Iowa, USA. 387 p.

- Leslie, J. F., 1995.** *Gibberella fujikuroi*: available populations and traits. Can. J. Bot. 73: S282-S291.
- Leyva-Mir, S. G., Vega-Portillo, H. E., Villaseñor-Mir, H. E., Tlapal-Bolaños, Vargas-Hernández, B. M., Camacho-Tapia, M., and Tovar-Pedraza, J. M., 2017.** Caracterización de especies de *Fusarium* causantes de pudrición de raíz del trigo en el bajío, México. Chilean J. Agric. Anim. Sci. Ex Agro-Ciencia 33: 142-151.
- Leyva-Madrigal, K. Y., Larralde-Corona, C. P., Apodaca-Sánchez, M. A., Quiroz-Figueroa, F. R., Mexia-Bolaños, P. A., Portillo-Valenzuela, S., Ordaz-Ochoa, J., and Maldonado-Mendoza, I. E., 2014.** *Fusarium* species from the *Fusarium fujikuroi* species complex involved in mixed infections of maize in Notttherm Sinaloa, Mexico. J. Phytopathol 163: 486-4496.
- Li-Jun, M., Geiser, D. M., Proctor, R. H., Rooney, P. A., O'Donnell, K., Trail, F., Gardiner, M. D., Manners, M. J., and Kasan, K., 2013.** *Fusarium* Pathogenics. Ann Rev. Microbiol. 67: 399-416 pp.
- Linderman, R. G., 1981.** *Fusarium* diseases of flowering bulb crops. In: *Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy* (eds. P. E. Nelson, T. A. Toussoun and R. J. Cook). The Pennsylvania State University Press, University Park: 129-141 pp.
- Madania, A., Altawil, M., Naffaa, W., Volker, P. H., and Hawat, M., 2013.** Morphological and molecular characterization of *Fusarium* isolated from maize in Syria. J. of Phytopathology 161: 452- 458
- Marasas, W. F., Rheeder, J. P., Laprecht, S. C., Zeller, K. A., Leslie, J. F., 2001.** *Fusarium andiyazi* sp. nov., a new species from sorghum. *Mycologia*. 93: 1203-1210.
- Martínez, E. F., Martínez, J. P., Guillén, S. D., Peña, C. G., and Hernández, H. V. M., 2015.** Diversidad de *Fusarium* en las raíces de caña de azúcar (*Saccharum o cinarum*) en el estado de Morelos, México. Rev. Mex. Micol. 42: 33-43.
- Martínez-Cruz, L., 1996.** Detección de insectos plaga en blueberry (*Vaccinium ashie* R.), en Zacatlán, Pue., México. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. 86 p.
- Maust, B. E., Williamson, J. G., and Darnell, R. L., 1999.** Flower bud density affects vegetative and fruit development in field-grown southern highbush blueberry. HortScience 34: 607-610.
- Michielse, C. B., and Martijn, R., 2009.** Pathogen prolife update: *Fusarium oxysporum*. Molecular Plant Pathology. 10: 311-324.

- Mishra, P. K., Fox, R. T. V., & Culham, A., 2003.** Inter-simple sequence repeat and aggressiveness analyses revealed high genetic diversity, recombination and range dispersal in *Fusarium culmorum*. *Annals of applied Biology* 143: 291-301.
- Mondragón, F. A., López, M., J., Ochoa, A. S., y Gutiérrez, C. M., 2012.** Hongos Asociados a la Parte Aérea del Arándano en Los Reyes, Michoacán, México *Revista Mexicana de Fitopatología* 30:141-144.
- Moretti, A., Mulé, G., Susca, A., González, M. T., Logrieco, A., 2004.** Toxin profile, Fertility and AFLP analysis of *Fusarium verticillioides* from banana fruits. *European Journal of Plant Pathology*. (110): 601-609.
- Moreno, V. M., Yañez, M. M. J., Rojas, M. R. I., Zavaleta, M. E., y Trinidad, S. A., 2005.** Diversidad de hongos en semillas de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) y su caracterización molecular. *Rev. Mex. Fitopatol.* 23: 111-118.
- Mulè, G., Susca, A., Stea, A., 2003.** Specific detection of the toxigenic species *Fusarium proliferatum* and *F. oxysporum* from asparagus plants using primers based on calmodulin gene sequences. *230: 253-240*.
- Mullis, K. B., 1990.** The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am.* 262: 56-61.
- Nason, A., 1965.** *Biología*. Ed. Limusa, Mexico, 350 p.
- Nelson, P. E., Horst, R. K., and Woltz, S. S., 1981.** *Fusarium* diseases of ornamental plants. In: *Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy* (eds. P. E. Nelson, T. A. Toussoun and R. J. Cook). The Pennsylvania State University Press, University Park: 121-128 pp.
- Nelson, P. E., Toussoun, T. A., and Marasas, W. F. O., 1983.** *Fusarium* species: An illustrated Manual for identification. Pennsylvania State University, University Park, PA.
- Nirenberg, H., 1976.** Untersuchungen über die morphologische und biologische Differenzierung in der *Fusarium*-Sektion *Liseola*. *Mitt. Biol. Bundesanst. Landu. Forstwirtschaft. Berlin-Dahlen*. 69 p.
- Nirenberg, H. and O'Donnell, K., 1998.** New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*. 90: 434.
- Noda, H., Bueno, C. R., and Silva, D. F., 1991.** Genetic erosion threatens native Amazonian vegetable crops. *Diversity*. 7: 62-3.
- Ochoa, F. Y. M., Cerna, C. E., Gallegos, M. G., Landeris, F. J., Delgado, O. J. C., Hernández, C. S., Rodríguez, G. R., y Olalde, P. V., 2012.** Identificación de especies de *Fusarium* en semillas de ajo en agascalientes, México. *Rev. Méx. de Micol.* 36: 27-31.

- O'Donnell, K., and Cigelnik, E., 1997.** Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic linaje of the fungus *Fusarium* are monorthologous. *Mol. Phylo. Evol.* 7: 103-116.
- O'Donnell, K., Kistler, H., Cigelnik, E., and Ploetz, R., 1998.** Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95: (5) 2044-2049.
- O'Donnell, K., Nirenberg, H. I., Aoiki, T., Cigelnik, E., 2000.** A multigene phylogeny of the *Gibberella fugikuroi* species complex: Detection of additionally phylogenetically distinct species. *Mycoscience*. 41: 61-78.
- O'Donnell, K., Sutton, D. A., Rinaldi, M. G., Gueidan, C., Crous, P. W., and Geiser, D. M., 2009.** Novel multilocus sequence typing scheme reveals high genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium incarnatum*-*F. equiseti* and *F. chlamydosporum* species complexes within the United States. *J. Clin Microbiol* 47: 3851-3861 pp.
- Olalde-Lira, G. G., Vargas-Sandoval, M., Ávila-Val, T del C., Raya-Montaña, Y. A., Delgado-Valerio, P., y Lara-Chávez, Ma. B. N., 2017.** Caracterización molecular del agente causal de la secadera del gladiolo. *Agroproduc.* 10: 87-90.
- Ordaz, O. J. A., 2017.** Identificación genética y patogénica de especies de *Armillaria* (Vahl.: Fr.) Karsten Asociadas a *Persea americana* Miller variedad *drymifolia* (Schltdl. y Cham.) S. F. Blake. Tesis de Maestría. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 50.
- Ortoneda, M., Guarro J., Madrid, M., Caracuel, Z., Roncero, M. I., Mayayo, E., and Di Pietro, A. 2003.** *Fusarium oxysporum* as a Multihost Model for the Genetic Dissection of Fungal Virulence in Plants and Mammals. *Infection and immunity* 72: 1760-1766.
- Parmeter, J. R., Whitney, H. S., and Platt, W. D., 1967.** Affinities of some *Rhizoctonia* species that resemble mycelium of *Thanatephorus cucumeris*. *Phytopathology* 57: 218-223.
- Paull, R. E., Chen, N.J., and Fukuda, S. K., 1988.** Planting dates related tuberous root yield, vine length, and quality attributes of yam bean. *Hort Science (USA)*. 23: 326-329.
- Pérez, V. O. A., Yañez, M. M. J., Alvarado, R. D., Cibrian, T. D., y García, D. S. E., 2005.** Hongos asociados a eucalipto. *Agrociencia*. 39: 311-318.
- Ploetz, R. C., 2007.** Diseases of tropical perennial crops. Challenging problems in diverse environments, *Plant Dis.* 91:6.
- Pritts, M., and Hancock, J., 1992.** Highbush Blueberry Production Guide. New York, Northeast Regional Agricultural Engineering Service. 200 p.

- Qu, B., Li, H. P., Zhang, J. B., Xu, Y. B., Huang, T., and Wu, A. B., 2008.** Geagraphic Distribution and Genetic Diversity of *Fusarium graminearum* and *Fusarium asiaticum* on Wheat Spikes Throughout China. *Plant Pathology*. 57: 15-24.
- Quiroz, S. V. F., Ferrera, C. R., Alarcón, A., y Lara, H. M. E., 2008.** Antagonismo *in vitro* de cepas de *Aspergillus* y *Trichoderma* hacia hongos filamentosos que afectan al cultivo del ajo. *Revista Mexicana de Micología* 26: 27-34.
- Raabe R.D., Cannors I. L., y Martinez A. P., 1981.** Checklist of plant disease in Hawaii. Hawaii Institute of Tropical Agriculture and Human Resources. University of Hawaii. Information test series no. 22: 313.
- Rabodonirina, M., Piens M. A., Monier M. F., Guého E., Fiére D., y Mojon M., 1994.** *Fusarium* infections in immunocompromised patients: case reports and literature review. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 13:152-161.
- Rodríguez, A. G., Betancour, R. I., Rodríguez, F. R., Velázquez, M. J. J., Fernández, P. S. P., and Gómez, D. N. 2012.** Vegetative compatibility Groups Characterization of *Fusarium* mexicanun causing mango malformation in Jalisco, México. *Fitopatología* 30: 128.140.
- Salazar-González, C., Serna-Cock, L., y Gómez-López, E., 2016.** Caracterización molecular de *Fusarium* asociado a pudrición basal de fruto en pitahaya (*Selenicereus megalanthus*). *Agron. Mesoan.* 27: 277-285.
- Salleh, B., 1994.** Diversity of pathogenic and toxigenic fusaria in Southeast Asia. *Soil Microorganisms Tsukuba Office of MAFF Research Council* 1994. (12). 135: 5-7.
- SAGARPA. 2016.** Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesca. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. <http://www.siea.sagarpa.gob.mx>. (Fecha de consulta: 03/01/2018).
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Schare, J. S., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K.B., and Erlich, A. H., 1988.** Primer-Directed Emzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science* 239 (4839): 487-491.
- Sakai, A., Ozeki, Y., Sasaki, Y., Suzuki, C., Masui, Y., Aihara, M., Kikuchi, Y., Takatorik, K., 2006.** Identification of fungi using DNA sequences an approach to identify *Fusarium* species isolated from domestic unpolished rice. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi.* 47: 268276.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., y Maniatis, T., 1989.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, EE.UU.
- Schlotterer, C., 2004.** The evolution of molecular markers—just a matter of fashion. *Nature Reviews* 5: 63-69.

- Shahnazi, S., Meon, S., Vadamalai, G., Ahmad, K., Nejat, N., 2012.** Morfological and molecular characterization of *Fusarium* spp. Associated with yellowing disease of black pepper (*Piper nigrum* L.) in Malaysia. *Journal of general Plant Pathology*. 78: 160-169.
- SIAP, 2016.** Panorama Agroalimentario. Berries, 2016. FIRA URL: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200633/Panorama_Agroalimentario_Berries_2016.pdf, accesada 10 de enero del 2018.
- Sinden, R. R., 1994.** *DNA Structure and Function*. Academic Press, EE.UU. 398 p.
- Sisterna, M., Pérez, B. A., Divo de Sesar, M., and Wright, E., 2009.** Blueberry blight caused by *Bipolaris cynodontis* in Argentina. *Plant Pathology* 58: 399.
- Sneh, B., Burpee, L., Ogoshi, A., 1991.** Identification of *Rhizoctonia* species. (eds). APS Press. St. Paul. 598 p.
- Stalpers, J. A., Andersen, T. F., 1996.** A synopsis of the taxonomy of teleomorphs connected with *Rhizoctonia* s.l. In: *Rhizoctonia* species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control (Sneh B., Jabaji-Hare S., Neate S., Dijst G., eds.). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. 49-63.
- Steenkamp, T. E., Wingfield, B. D., Desjardins, F. A., Marasas W. F. O., Wingfield, J. M., 2002.** Cryp speciation in *Fusarium subglutinas*. *Mycol*. 91: 1032-1043.
- Steenkamp, T. E., Britz, H., Countinho, T. A., Wingfield, B. D., Marasas W. F. O., Wingfield, J. M., 2000.** Molecular characterization of *Fusarium subglutinans* associated with mango malformation. *Mol. Plant Pathol* 1:187-193.
- Kumar, S., Stecher, G., and Tamura. K., 2015.** MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0. *Molecular Biology and Evolution* (submitted).
- Summerell, B. A., Salleh, B., and Leslie. J. F., 2003.** A utilitarian approach to *Fusarium* identification. *Plant Disease* 87:117-128.
- Sunnucks, P., 2000.** Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology and Evolution* 15: 199-20.1
- Tamura, K., and Nei, M., 1993.** Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10: 512-526 pp.
- Thangavelu, R., Kumar, M. K., Devi, G. P., Mustaffa, M. M., 2012.** Genetic Diversity of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* Isolates (Foc) of India by Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) Analysis. *Molecular Biotechnology*. 51: 203-211.

- Thrane, U., 2001.** Developments in the taxonomy of *Fusarium* species base on secondary metabolites en *Fusarium: Paul E. Nelson Memorial Symposium*. American Phytopathological Society, St. Paul Minnesota. 29: 49.
- Tomoika, K., Hirooka, Y., Takezaki, A., Aoiki, T., Sato, T., 2011.** Fusarium root rot of prairie gentian caused by species belonging to the *Fusarium solani* species complex. *Journal of General Plant Pathology*. 77: 132-135.
- Torbati, M., Arzanlou, M., Sandoval-Denis, M., and Crous, P. W., 2018.** Multigene Phylogeny reveals new fungicolous species in the *Fusarium tricinctum* species complex and novel hosts in the *Fusarium* from Iran. In *Mycological Progress*. <https://doi.org/10.1007/s11557-018-1422-5>. (Consultado 14/02/2018).
- Toussonun, T. A., and Nelson, P. E., 1975.** Pictorial guide to the identification of *Fusarium* species. 2da ed. Pennsylvania State University Press. University Park, Pennsylvania. 8 p.
- Travaglini E. C., 1973.** Methods for the extraction and purification of desoribonucleic acid from eukariote cells. En: D. M. Prescott (ed.). *Methods in cell biology*. Academic Press, EE.UU.
- Trehane, J., 2004.** Blueberries, Cranberries and other Vacciniums. Timber Press, Portland y Cambridge. 256 p.
- Velásquez, V. R., Medina, A. M. M., 2004.** Guía para conocer y manejar las enfermedades más comunes de la raíz del ajo en Aguascalientes y Zacatecas. Folleto para productores No. 34. INIFAP y Centro de investigación regional norte-centro campo experimental pabellón.
- Victoriano, M. H., 2010** Organogenesis in vitro de arandano *Vaccinium corymbosum* L. Tesis de maestria. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional. CIDIR-Michoacán. Instituto Politécnico Nacional. 60 p.
- Vogelgsang, S., Sulyok, M., Bänziger, I., Krska, R., Schuhmacher, R., & Forrer, H. R., 2008.** Effect of fungal strain and cereal sustrate on *in vitro* mytoxin production by *Fusarium poae* and *Fusarium avenaceum*. *Food Additives and Contaminants*. 25: 745-757.
- Watanabe, M., Yonezawa, T., Lee, K., Kumagai, S., Sugita-Konishi, Y., Goto, K., Hara-Kudo, Y., 2011.** Evaluation of genetic markers for identifying isolate of the species of the genus *Fusarium*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91: 2500-2504.
- Ward, E., 1994.** Use of polymerase chain reaction for identifying plant pathogens. En: *Ecology of Plant Pathogens*. J. P. Blakeman y B. Williamson, eds. CAB International, Oxon, UK. 143-160.
- Wilson, A., Simpson, D., Chandle, E., Jennings, P., Nicholson, P., 2004.** Devolopment of PCR assay for the detection and differentiation of *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium langsethiae*. *FEMS Microbiology Letters*. 233: 69-76.

- Williamson, J., Lyrene, P., 2004.** Blueberry gardener's guide. Florida Cooperative Extension Service. University of Florida. CIR1192.
- White, T. J., Burns, T. D., Lee, S. B. and Taylor, J. W., 1990.** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics 315-322. In Innis, M. A. D. H. Gelfald, J. J. Sninsky, and T. J. White (eds) PCR Protocol: A Guide to Methods and Application. Academic Press, Inc., New York, USA:
- Wright, E.R.; Cotta. A. G., 1996.** Atizamiento del arándano (*Vaccinium corymbosum*) ocasionado por *Fusarium* spp. Pág. 124 En: Actas del VIII Congreso Latinoamericano de Horticultura. Montevideo, Uruguay.
- Yli-Mattila, T., Mach, R. L., Alekhina, I. A., Bulat, S. A., Koskinen, S., Kullnig-Grandinger, C. M., Kubicek, C. P., Klemsdal, S. S., 2004.** Phylogenetic Relationship of *Fusarium langsethiae* to *Fusarium poae* and *Fusarium sporotrichioides* as inferred by IGS, ITS and B-tubulin sequences and UP-PCR hybridization análisis. International Journal of Food Microbiology. 95: 267-285.
- Zaccardelli, M., Vitale, S., Luongo, L., Merighi, M., Corazza, L. 2008.** Morphological and molecular characterization of *Fusarium solani* isolates. Journal of Phytopathology 156: 534-541.
- Zeller, K. A., Bowden, R. L., Leslie, J. F., 2003.** Diversity of epidemic populations of *Gibberella zeae* from small quadrats in Kansas and North Dakota. Phytopathology. 7: 874-880.

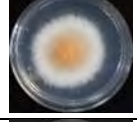
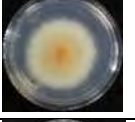
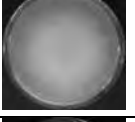
VII APENDICE

Cuadro 1A. Comparación de secuencias de ADN en homología con secuencias de base de datos del banco de genes (NCBI GenBank) mediante software BLAST-N.

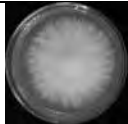
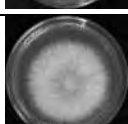
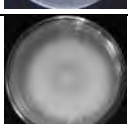
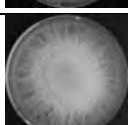
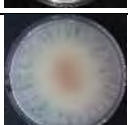
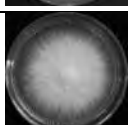
CEPA	ESPECIE	COVERTURA %	VALOR DE “E”	% DE IDENTIDAD	NUMERO DE ACCESION
LRE1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>fragariae</i>	99 %	0.0	100 %	KX456095
LRE2	<i>F. oxysporum</i>	98 %	0.0	99.71 %	KP840551
LRE3	<i>F. subglutinans</i>	94 %	0.0	100 %	KU508365
TAN4	<i>F. subglutinans</i>	94 %	0.0	100 %	KU508365
TAN5	<i>F. subglutinans</i>	92 %	0.0	100 %	KU508365
TAN6	<i>F. oxysporum</i>	97 %	0.0	98.83	MK158493
SAN7	<i>F. oxysporum</i>	100 %	0.0	100 %	MG196641
SAN8	<i>F. oxysporum</i>	98 %	0.0	99.71 %	KP840551
SAN9	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>opuntiarum</i>	100 %	0.0	99.71 %	DQ837689
ZAM10	<i>F. subglutinans</i>	94 %	0.0	100 %	KU508365
ZAM11	<i>F. subglutinans</i>	93 %	0.0	100 %	KU508365
ZIR12	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>fragariae</i>	98 %	0.0	100 %	KX456095
ZIR13	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>fragariae</i>	100 %	0.0	100 %	KX456095
ZIR14	<i>F. oxysporum</i>	100 %	0.0	100 %	MG196641
TAC15	<i>F. oxysporum</i>	100 %	0.0	100 %	MG196641
TAC16	<i>F. oxysporum</i>	99 %	0.0	99.71 %	KP840551
TIR17	<i>F. subglutinans</i>	94 %	0.0	100 %	KU508365
TIR18	<i>F. subglutinans</i>	94 %	0.0	100 %	KU508365
ZIR19	<i>F. subglutinans</i>	94 %	0.0	100 %	KU508365
ZIH20	<i>F. subglutinans</i>	94 %	0.0	100 %	KU508365
ZIH21	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>fragariae</i>	100 %	0.0	100 %	KX456095
ZIH22	<i>F. oxysporum</i>	100 %	0.0	100 %	MG196641
ZIH23	<i>F. oxysporum</i>	100 %	0.0	100 %	MG196641

E=Valor estadístico, cuanto menor sea el valor de “E”, más mejor o más homologo es su alineamiento.

Cuadro 2A. Características morfológicas y culturales de cepas del género *Fusarium*., obtenidas de plantas de arándano con síntomas de pudrición de raíz.

Cepa	Macroconidios				Microconidios		Fialide	Clamidosporas	Forma y Color de la Colonia	Hifas enrolladas	Especie	Cepas	
	Tamaño	Forma	Ápice	Pie	Tamaño	Forma						Anverso	Reverso
LRE1	14.72 µm X 4.35 µm	Lado dorsal más curvado que el ventral 1-3 septos	Gancho	Pie	8.45 µm X 4.14 µm	Oval un septo	Cortas y largas	Terminales e intercalares	Anverso blanco violeta (17, A2), flocoso, aéreo. Reverso blanco amarillento (3,A2) Crecimiento	Ausentes	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>fragariae</i>		
LRE2	18.52 µm X 4.19 µm	Esvelto derecho como una aguja 3septos	Embotada	Pie	9.45 µm X 3.47 µm	Oval	Cortas y largas	En cadena terminales	Anverso rojo pálido (7, A3) en el centro blanco(5, A1), flocoso, aéreo. Reverso blanco amarillento (2,A5)	Ausentes	<i>F. oxysporum</i>		
LRE3	13.34 µm X 4.18 µm	El lado dorsal más curvado que el ventral 3 septos	Embotada	Pie	8.09 µm X 3.18 µm	Oval periforme	Largas	En cadena terminales intercalares	Anverso blanco (5, A1) algodonoso-flocoso aéreo. Reverso amarillo claro en el centro (2,A5)	Presente	<i>F. subglutinans</i>		
TAN4	16.58 µm X 4.33 µm	El lado dorsal más curvado que el ventral 1 septo	Embotada	Pie	8.89 µm X 3.18 µm	Oval	Largas	En cadenas terminales	Anverso blanco (5 A1) flocoso abundante aéreo. Reverso blanco grisáceo (12,B1)	Presente	<i>F. subglutinans</i>		
TAN5	27.17 µm X 4.43 µm	Esvelto derecho como una aguja 1-3 septos	Embotada	Pie	9.0 µm X 3.13	Reniforme Un septo Oval	Largas	En pares Pares lisas	Anverso naranja pálido (5, A3), blanco amarillento en el centro (2, A2) flocoso aéreo. Reverso amarillo claro en el centro (2, A5)	Ausente	<i>F. subglutinans</i>		
TAN6	30.21 µm X 17.38 µm	Lado dorsal más curvo que lado ventral 1-4 septos	Largo, disminuyendo en un punto, Embotada	Pie	9.91 µm X 4.31 µm	Ovoboide Oval Un septo	Cortas y largas	Simple	Anverso blanco (5, A1) y en el centro Naranja persa (6, A7) algodonoso-flocoso. Reverso centro naranja claro (5, A7)	Ausentes	<i>F. subglutinans</i>		
SAN7	22.51 µm X 5.23 µm	El lado dorsal más curvado que el ventral 3 septos	Embotada	Pie	10.31 µm X 3.95 µm	Oval Un septo	Cortas y largas	En pares de pared lisa	Anverso blanco (5, A1) algodonoso-flocoso aéreo. Reverso blanco amarillento (1, A2)	Presente	<i>F. oxysporum</i>		
SAN8	22.55 µm X 5.14 µm	El lado dorsal más curvado que el ventral 3 septos	Embotada	Pie	11.09 µm X 4.58 µm	Ovoides Reniformes Un septo	Largas	Simple	Anverso blanco (5, A1) algodonoso-flocoso aéreo, Reverso blanco amarillento (1, A2)	Ausente	<i>F. oxysporum</i>		

Continuación Cuadro 2A.

Cepa	Macroconidios				Microconidios		Fialide	Clamidos-poras	Forma y Color de la Colonia	hifas enrolladas	Especie	Cepas	
	Tamaño	Forma	Ápice	Pie	Tamaño	Forma						Anverso	Reverso
SAN9	50.56 µm X 5.88 µm	Esvelto, recto Lado dorsal más curvado que el ventral 0-4 septos	Embotada	Pie	12.35 µm X 4.03 µm	Oval	Largas	Simple	Anverso blanco (5, A1) en el centro blanco anaranjado (5, A2) floccoso-algodonoso aéreo. Reverso blanco con centro marrón naranja (7, C3)	Presente	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>opuntiarum</i>		
ZAM 10	23.27 µm X 4.87 µm	Corto, lado dorsal más curvado que el ventral Escasos 1-3 septos	Embotada	Pie	9.38 µm X 3.63 µm	Oval	Largas y cortas	En cadena	Anverso Naranja claro (5, A4) en el centro blanco (5, A1) floccoso-algodonoso aéreo, Reverso: anillos blanco amarillento (3, A4) café grisáceo (8, F3)	Ausente	<i>F. subglutinans</i>		
ZAM 11	13.68 µm X 4.25 µm	El lado dorsal más curvado que el ventral 1 septo	Embotada	Pie	8.97 µm X 3.83 µm	Oval Un septo	Cortas	En cadena Simples	Anverso blanco (5, A1) en el centro color violeta pálido (17, A3) algodonoso-floccoso aéreo. Reverso amarillo dorado (4, B4)	Ausente	<i>F. subglutinans</i>		
ZIR12	23.10 µm X 4.26 µm	El lado dorsal más curvado que el ventral 1 septo	Embotada	Pie	9.53 µm X 3.46 µm	Oval Un septo	Cortas Mono	En pares	Anverso, blanco (5, A1) floccoso aéreo. Reverso blanco amarillento (1, A2)	Ausente	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>fragariae</i>		
ZIR13	23.32 µm X 4.86 µm	Esvelto, derecho como una aguja 1-4 septos	Embotada	Pie	12.42 µm X 3.95 µm	Reniforme Un septo	Largas y cortas	Pared verrucosa	Anverso blanco rojizo (8, A2) floccoso aéreo. Reverso café rojizo (9, D4)	Ausente	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>fragariae</i>		
ZIR14	20.92 µm X 4.83 µm	El lado dorsal más curvado que el ventral 1-3 septos	Gancho	Pie	10.11 µm X 3.69 µm	Oval Un septo	Cortas	En cadena	Anverso blanco (5, A1) floccoso-algodonoso aereo, reverso blanco amarillento (1, A2)	Presente	<i>F. oxysporum</i>		
TAC15	23.19 µm X 4.74 µm	El lado dorsal más curvado que el ventral Muy escasos	Embotada	Pie	11.14 µm X 4.04 µm	Oval Un septo	Cortas	En pares Lisa	Anverso radial, blanco (5, A1) algodonoso-floccoso, aéreo reverso blanco amarillento (1, A2)	Ausente	<i>F. oxysporum</i>		
TAC16	20.76 µm X 4.74 µm	El lado dorsal más curvado que el ventral 1-2 septos	Embotada	Pie	8.94 µm X 3.86 µm	Oval Un septo	Largas y cortas	Ausentes	Anverso blanco (5, A1) en el centro color rojo pálido (8, A3) floccoso aéreo. Reverso café rojizo (9, D, 4)	Presente	<i>F. oxysporum</i>		

Continuación Cuadro 2A.

Cepa	Macroconidios				Microconidios		Fialide	Clamidos-poras	Forma y Color de la Colonia	hifas enrolladas	Especie	Cepas	
	Tamaño	Forma	Ápice	Pie	Tamaño	Forma						Anverso	Reverso
TIR17	46.99 µm X 5.51 µm	El lado dorsal más curvado que el ventral Esbelto 0-3 septos	Embotada	Pie	14.05 µm X 4.20 µm	Oval Un septo	Largas y cortas	Ausentes	Anverso blanco (5, A1) con anillo concentrico color naranja pálido (5, A3) flocoso aéreo. Reverso, amarillo claro (4,B5)	Ausente	<i>F. subglutinans</i>		
TIR18	29.38 µm X 4.72 µm	Esvelto, recto Robusto Ligeramente curvado 1 septo	Embotada	Pie	12.44 µm X 4.09 µm	Oval Un septo	Largas	En pares Pared lisa	Anverso blanco (5, A1) anillo concéntrico naranja (6, A6) flocoso, aéreo. Reverso amarillento café (5, D6)	Ausente	<i>F. subglutinans</i>		
ZIR19	Ausentes				9.60 µm X 3.82 µm	Oval	Largas	En cadenas	Anverso blanco anaranjado (5, A2) algodonoso-flocoso. Reverso amarillo grisáceo (3,B4)	Ausente	<i>F. subglutinans</i>		
ZIH20	20.61 µm X 5.08 µm	Esbelto, recto como aguja Escasos 1 septo Escasos	Embotada	Pie	9.27 µm X 3.71 µm	Oval	Cortas	En cadenas	Anverso blanco rojizo (13, A2) flocoso aéreo, Reverso blanco amarillento (1, A2) centro café rojizo (8,E4)	Ausente	<i>F. subglutinans</i>		
ZIH21	25.32 µm X 4.56 µm	El lado dorsal más curvado que el ventral 3 septos	Embotada	Pie	10.99 µm X 3.80 µm	Oval Un septo	Cortas y largas	Simples Pares	Anverso blanco rojizo (13, A2) algodonoso flocoso, Reverso blanco amarillento (1, A2) con centro café rojizo (8, E4)	Ausente	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>fragariae</i>		
ZIH22	25.51 µm X 4.46 µm	El lado dorsal más curvado que el ventral Recto 0-5 septos	Embotada	Pie	10.21 µm X 4.08 µm	Oval Reniforme Un septo	Cortas y largas	Simples En pares Verrucosas	Anverso blanco (5, A1) con centro color blanco rojizo (13, A2) algodonoso-flocoso aéreo. Reverso blanco amarillento (1, A2) café en el centro (6, E3)	Ausente	<i>F. oxysporum</i>		
ZIH23	26.40 µm X 4.44 µm	El lado dorsal más curvado que el ventral 0-3 septos	Papilado	Pie	9.79 µm X 3.95 µm	Oval	Cortas	Simples En pares Verrucosa	Anverso blanco (5, A1) flocoso- algodonoso aéreo, reverso blanco amarillento (1, A2) violeta opaco en el centro (16, E3)	Ausente	<i>F. oxysporum</i>	