

# UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS E INGENIERÍA  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS Y  
AGROPECUARIAS

Caracterización morfológica, fisiológica y molecular de cinco aislamientos de  
*Fusarium* spp. en espárrago (*Asparagus officinalis* L.) de la región de  
Caborca, Sonora, México.



**Dora Angélica Lizárraga Murrieta**

H. Caborca, Sonora

Noviembre, 2017.

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**“El saber de mis hijos  
hará mi grandeza”**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del jurado designado para revisar el trabajo de Tesis de **Dora Angélica Lizárraga Murrieta**, lo han encontrado satisfactorio y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Químico Biólogo Clínico, otorgado por la Universidad de Sonora, Unidad Regional Norte, Campus Caborca.

---

Presidente

Dra. Yolanda Flores Lara

---

Secretario

M. C. Ramón Efraín Lugo Sepúlveda

---

Vocal

Dr. Jesús Ortega García

---

Suplente

Dra. Dora Edith Valencia Rivera

## **DEDICATORIAS**

### **A mis padres:**

María Dolores y Nazario por todo el apoyo brindado durante toda mi carrera y en toda mi vida, por guiarme y confiar en mí, porque sé que sin ustedes yo no habría llegado hasta donde estoy, por haber cuidado de mi hijo y ser unos padres excelentes para el como lo son conmigo y mis hermanas. Por todos sus regaños y consejos y aunque no esté de acuerdo en muchas cosas con ustedes sé que me aceptan tal cual soy y me aman. Por todo eso y más.

### **A mis hijos:**

Ángel Fabián y Coraline por llenar mi vida de alegría cada día, porque por ustedes y para ustedes sigo esforzándome diariamente para poder darles lo mejor de mí. No soy la mejor madre por descuidarlos para ofrecerles lo mejor pero los amo y todos mis logros son por ustedes.

### **A mis hermanas:**

Cristina, Brenda y Mary Helen por apoyarme en todas mis decisiones, por cuidar de mis hijos y estar ahí cuando las necesito. Por no dejarme caer en los momentos difíciles y aunque las odie a veces y ustedes a mí sé que estaremos juntas a pesar de todo.

### **A mis maestras:**

Beatriz Arias, Patricia Delgado y Yolanda Flores por todo el apoyo durante y al final de mi carrera, por confiar en mí y enseñarme las cosas más importantes y que me gustan de mi carrera. Una disculpa enorme si alguna vez las llegue a decepcionar. Sin su apoyo académico y no habría llegado hasta aquí.

### **A toda mi familia:**

Por todo el apoyo incondicional que me han brindado, por aceptarme tal cual soy y por ser la familia más loca y rara

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad de Sonora, Campus Caborca por ser mi universidad y casa de estudios, por darme la oportunidad de prepararme académicamente.

Le agradezco a la Dra. Yolanda Flores Lara por todo el apoyo brindado durante este trabajo, por haber invertido todo este tiempo en mí y ser mi asesora. Por haberme enseñado tantas cosas que me servirán para mi trabajo laboral.

Les agradezco infinitamente a Janet Vázquez Solorio, Linda Yareth Reyna Reyna y Ambar Carolina Cid Galaz por ser parte de este trabajo, por invertir su valioso tiempo y dedicarle lo mejor de ustedes.

Les agradezco a la M. C. Beatriz Arias Tobin y a la M. C. Patricia Delgado Quintanar por ser mis maestras favoritas durante toda mi carrera, por enseñarme tantas cosas y por confiar en mí. Les agradezco por aceptarme en sus áreas de trabajo y compartir conmigo sus conocimientos.

Les agradezco a mis padres por apoyarme y aconsejarme, por ser unos padres ejemplares para mí y mis hermanas, por cuidar de mis hijos y quererlos.

Les agradezco a mis hermanas por apoyarme y estar conmigo, por cuidar de mis hijos y quererlos como si fueran suyos.

Le agradezco a mi jefe el Ing. Luciano Cruz Martínez por apoyarme en la decisión de comenzar este trabajo y por ser tan bueno.

Le agradezco a la M. C. Adriana Contreras Valenzuela mi compañera de laboratorio, por el apoyo brindado y sus buenos consejos para la realización de este trabajo y por dedicarme su tiempo.

## CONTENIDO

	Página
<b>DEDICATORIAS</b>	iii
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	iv
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	vii
<b>LISTA DE TABLAS</b>	viii
<b>RESUMEN</b>	ix
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2. ANTECEDENTES</b>	3
2.1. Producción de espárrago	3
2.2. Cultivo del espárrago	4
2.2.1. Características botánicas de la planta	4
2.3. Factores limitantes de la producción	5
2.4. <i>Fusarium</i> y Metabolitos secundarios	7
2.5. Formas saprofitas	8
2.6. <i>Fusarium</i> spp. como patógeno oportunista en humanos	8
2.7. Pudrición de la corona	9
2.7.1. Sintomatología de <i>Fusarium</i> spp.	11
2.8. Aislamiento de especies de <i>Fusarium</i>	12
2.8.1. Aislamiento a partir de tejido enfermo de plantas	13
2.9. Medios de cultivo para aislar <i>Fusarium</i> spp.	15
2.9.1. Agar verde de Malaquita (MGA)	16
2.9.2. Jugo V-8 Agar	16
2.10. Cultivos monospóricos	16
2.11. Medios de cultivo para el crecimiento e identificación de <i>Fusarium</i> spp.	17
2.11.1. CLA	18
2.11.2. Agar Spezieller Nährstoffarmer (SNA)	19
2.11.3. PDA	19
2.12. Medios de identificación suplementarios	20

2.12.1.	Agua agar 2% (WA)	20
2.12.2.	Agar suelo (SA)	20
2.12.3.	Agar KCl	21
2.13.	El género <i>Fusarium</i> spp.	21
2.13.1.	Pigmentación de <i>Fusarium</i> spp.	25
2.13.2.	Genoma de <i>Fusarium</i> spp.	25
2.13.3.	Formae speciales ( <i>F. sp.</i> )	26
2.13.4.	Taxonomía de <i>Fusarium</i> spp.	28
2.14.	Sección Elegans	30
2.14.1.	<i>Fusarium oxysporum</i> Schlecht. Emend Snyder and Hans	33
2.14.2.	Descripción morfológica	33
2.15.	Sección Liseola	35
2.15.1.	<i>Fusarium proliferatum</i> (Matsushima) Nirenberg	35
2.15.2.	Descripción morfológica	36
2.16.	Factores asociados a la presencia de <i>Fusarium</i> spp.	37
2.17.	Manejo de la enfermedad causada por especies de <i>Fusarium</i>	38
<b>3.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b>	42
<b>4.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	43
4.1.	General	43
4.2.	Específicos	43
<b>5.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	44
5.1.	Colección de la fuente del inóculo	44
5.2.	Aislamiento del inóculo a partir de tejido enfermo y obtención de cultivos puros	45
5.3.	Preparación de cultivos monospóricos y de puntas de hifas	46
5.4.	Preparación de tubos de Sílica gel	48
5.5.	Identificación molecular de los aislamientos	48
5.5.1.	Preparación del homogenado y aislamiento de ADN	48
5.5.2.	Secuenciación de ADN	50
5.6.	Pruebas de patogenicidad	51
5.7.	Preparación de la suspensión stock de esporas	51

5.8.	Cuantificación de la concentración de la suspensión stock de esporas	52
5.9.	Diluciones para la preparación de la concentración de esporas deseada	53
5.10.	Inoculación de las plántulas de espárrago	53
5.11.	Reaislamiento del patógeno	55
5.12.	Determinación de las características del cultivo	55
5.12.1.	Producción de pigmentos y apariencia de la colonia	55
5.13.	Determinación de las características morfológicas de los aislamientos	56
5.13.1.	Forma y tamaño de las Microconidias y Macroconidias	56
5.13.2.	Producción de clamidosporas	60
5.13.3.	Tipos de fiálides	60
5.14.	Determinación de las características fisiológicas de los aislamientos	61
5.14.1.	Efecto de la temperatura sobre el crecimiento radial de los aislamientos de <i>Fusarium</i> spp.	61
5.14.2.	Efecto del pH sobre el crecimiento radial de los aislamientos de <i>Fusarium</i> spp.	61
5.14.3.	Efecto del fotoperiodo sobre el crecimiento radial de los aislamientos de <i>Fusarium</i> spp.	62
5.15.	Caracterización Físico-Química del suelo de las áreas muestreadas	62
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	64
6.1.	Caracterización molecular de los aislamientos	64
6.2.	Pruebas de patogenicidad	66
6.3.	Caracterización cultural de los aislamientos	67
6.3.1.	Aspecto de la colonia	67
6.3.2.	Producción de pigmentos	72
6.4.	Características morfológicas de los aislamientos	76
6.4.1.	Caracterización de longitud, ancho y forma de las Microconidias	76

6.4.2. Caracterización de longitud, ancho, número de septos y forma de las macroconidias	78
6.4.3. Caracterización de la presencia o ausencia de clamidosporas	81
6.4.4. Caracterización de tipos de fiálides	82
6.5. Caracterización fisiológica de los aislamientos	85
6.5.1. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento radial total de los aislamientos de <i>Fusarium</i> spp.	85
6.5.2. Efecto del fotoperiodo (luz blanca, luz ultravioleta y oscuridad) sobre el crecimiento radial total de los aislamientos de <i>Fusarium</i> spp.	87
6.5.3. Efecto del pH sobre el crecimiento radial total de los aislamientos de <i>Fusarium</i> spp.	90
6.6. Caracterización Físico-Química del suelo de las áreas muestreadas	92
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>95</b>
<b>8. RECOMENDACIONES</b>	<b>96</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>97</b>
<b>10. APÉNDICES</b>	<b>102</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Clasificación de <i>Fusarium</i> spp.	21
2.	Ciclo de vida generalizado de <i>Fusarium</i> spp.	24
3.	Microconidias	32
4.	Mapa de la Región de Caborca, Sonora mostrando los campos Angostura, Candelaria, Los Pinos, Coyote y Viva.	45
5.	Estriado para cultivo monospórico.	47
6.	Charolas para germinación de semillas de espárrago con papel de germinación y agua agar al 1 %.	51
7.	Cuadrícula de cámara de Neubauer.	52
8.	Diagrama de flujo de inoculación de plántulas de espárrago con 100 µL de una suspensión de esporas de <i>Fusarium</i> spp. a una concentración de $1 \times 10^5$ esporas/mL.	54
9.	Formas de microconidias de <i>Fusarium</i> spp. (Modificado de Leslie, <i>et al.</i> , 2006).	58
10.	Macroconidias de <i>Fusarium</i> spp. Mostrando formas de las células apicales y basales (Modificado de Leslie, <i>et al.</i> , 2006).	59
11.	Plántulas de espárrago mostrando necrosamiento en las raíces después de 10 días de infección con el aislamiento A. Viva ( <i>Fusarium nsp.</i> ) B. Los Pinos ( <i>F. proliferatum</i> ).	67
12.	Aspecto de la colonia del aislamiento Angostura en PDA.	70
13.	Aspecto de la colonia del aislamiento Candelaria en PDA.	70
14.	Aspecto de la colonia del aislamiento Los Pinos en PDA.	71
15.	Aspecto de la colonia del aislamiento Coyote en PDA.	71
16.	Aspecto de la colonia del aislamiento Viva en PDA.	72
17.	Aislamiento Angostura sembrado en PDA mostrando pigmentación.	73
18.	Aislamiento Candelaria sembrado en PDA mostrando pigmentación.	74

19.	Aislamiento Los Pinos sembrado en PDA mostrando pigmentación.	74
20.	Aislamiento Coyote sembrado en PDA mostrando pigmentación.	75
21.	Aislamiento Viva sembrado en PDA mostrando pigmentación.	75
22.	Aspecto de Macroconidias y microconidias (100X) A. Viva ( <i>Fusarium</i> nsp.) B. Coyote ( <i>F. oxysporum</i> )	80
23.	Aspecto de Macroconidias y microconidias aislamiento A. Angostura ( <i>F. proliferatum</i> ), B. Los Pinos ( <i>F. proliferatum</i> ), C. Candelaria ( <i>F. proliferatum</i> ). (100X)	80
24.	Clamidosporas en cadena observadas en el aislamiento Coyote ( <i>F. oxysporum</i> ) desarrollado en PDA después de 30 días.	81
25.	Monofiálide corta observada en el aislamiento Angostura ( <i>F. proliferatum</i> ) (40x).	83
26.	Monofiálide corta observada en el aislamiento Viva ( <i>Fusarium</i> nsp.) (40x).	83
27.	Monofiálide larga observada en el aislamiento Coyote ( <i>F. oxysporum</i> ) (40x).	84
28.	Polifiálide observada en el aislamiento Angostura ( <i>F. proliferatum</i> ) (100x).	84
29.	Polifiálide observada en el aislamiento Viva ( <i>Fusarium</i> nsp.) (40x).	85
30.	Comparación del crecimiento radial después de 7 días de 5 aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. bajo condiciones de 24 h de luz blanca en medio V-8.	88
31.	Comparación del crecimiento radial después de 7 días de 5 aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. bajo condiciones de 24 h de luz ultravioleta en medio V-8.	88
32.	Comparación del crecimiento radial después de 7 días de 5 aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. bajo condiciones de 24 h de oscuridad en medio V-8.	89

33. Comparación del crecimiento radial de 5 aislamientos de *Fusarium* spp. a pH 5, 6 y 7. 91
34. Comparación del crecimiento radial de 5 aislamientos de *Fusarium* spp. a pH 8, 9 y 10. 91

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Sistema taxonómico de 12 secciones propuesto por Nelson, Toussoun y Marasas.	30
2	Descripción de cinco campos muestreados.	45
3	Resultados de análisis moleculares de los aislamientos mediante el análisis de EF-1 $\alpha$ .	66
4	Pruebas de patogenicidad para cinco aislamientos de <i>Fusarium</i> spp.	67
5	Características de cultivo de cinco aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. en medio agar V-8.	69
6	Caracterización de microconidias de acuerdo a su forma, uniceluladas, biceluladas, tricheluladas en los 5 aislamientos de <i>Fusarium</i> spp.	77
7	Longitud y ancho de microconidias de 5 aislamientos de <i>Fusarium</i> spp.	77
8	Caracterización de número de septos, forma de la célula apical y basal de las macroconidias de 5 aislamientos de <i>Fusarium</i> spp.	79
9	Longitud y ancho de las macroconidias de 5 aislamientos de <i>Fusarium</i> spp.	79
10	Caracterización de forma y tamaño de clamidosporas para cinco aislamientos de <i>Fusarium</i> spp.	82
11	Crecimiento radial de la colonia de 5 aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. a seis temperaturas por 7 días.	87
12	Crecimiento radial de la colonia de 5 aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. bajo diferentes fotoperiodos por 7 días.	89
13	Crecimiento radial de 5 aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. en medio V-8 a seis pH diferentes después de 7 días.	92

14	Parámetros físicos y químicos de los suelos muestreados.	94
15	Estado nutricional de los suelos muestreado.	94

## RESUMEN

La región de Caborca, cuenta con más de 11 mil hectáreas sembradas de espárrago y es la de mayor producción en el Estado de Sonora, México. Su producción es de exportación y está destinada principalmente hacia los Estados Unidos. La producción de espárrago en la región genera numerosos empleos cada año, en las empresas de mayor tamaño se generan hasta 2 mil empleos tan solo en periodo de cosecha. Del año 2013 al 2016 la producción de espárrago creció de 125 mil toneladas a 208 mil 435 toneladas, lo que representa un aumento en términos reales del 66.5% a nivel nacional. La presencia de la pudrición de la corona, causada por el hongo *Fusarium* spp. reduce la rentabilidad y vida útil de este cultivo. El objetivo de este trabajo fue el de identificar molecularmente el/los agentes causales de esta enfermedad en la región y determinar si existen diferencias culturales, morfológicas, fisiológicas entre los diferentes aislamientos de *Fusarium* spp. obtenidos. Se seleccionaron cinco campos esparragueros de la Región de Caborca, Sonora, México con antecedentes de la enfermedad y se obtuvieron cinco muestras de coronas infectadas por cada campo. Se identificó molecularmente *F. proliferatum* como la especie más predominante, también se determinó la presencia de *F. oxysporum* f. sp. *meniscoideum*, y por último se estableció la presencia un aislado que parece ser una especie nueva dentro del complejo de especies de *Fusarium fujikuroi*, mediante el análisis de EF-1 $\alpha$ . Los aislamientos difirieron en características culturales y morfológicas como pigmentación, tamaño de microconidias y macroconidias, tipos de fiálides y arreglo de clamidosporas. El crecimiento de estos aislamientos también se vio afectado en forma diferente por factores como pH (5-10), fotoperiodo (luz blanca, luz ultravioleta, oscuridad) y temperatura (3-39°C). Esta investigación primeramente identifica a nivel molecular los agentes causales de FCRR a nivel regional, lo cual es primordial para cualquier enfermedad para la toma de decisiones sobre manejo de cultivo y control de las enfermedades. También establece las bases a nivel de laboratorio para el aislamiento y desarrollo de *Fusarium* spp. para futuros estudios ya sea genéticos, fisiológicos y/o de control de este patógeno.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las principales entidades productoras de espárrago en México son: Sonora, Baja California, Guanajuato, Baja California Sur y Querétaro los cuales representan el 98.9% de la oferta, lo que equivale a aproximadamente 206 mil 225 toneladas. El estado de Sonora es el productor de espárrago más importante a nivel nacional al contribuir con el 69.4% del valor de la producción y aporta un volumen de 129 mil 808 toneladas. El valor comercial del cultivo de espárrago se estima en 6 mil 485 millones de pesos, lo que equivale a 24 mil hectáreas sembradas (Godina, 2014). En Sonora, Caborca es la principal región productora de espárrago en el estado. Cuenta con más de 11 mil hectáreas sembradas y es la más importante por sus exportaciones hacia Estados Unidos. Asimismo, la producción de espárrago en la región genera numerosos empleos cada año, alrededor de dos mil empleados trabajan en las empresas más grandes tan solo en periodo de cosecha.

En la región de Caborca, año con año los productores de espárrago enfrentan diversos problemas fitosanitarios. Entre los que sobresalen la presencia de insectos dañinos, la infestación de malezas anuales y perennes, y la enfermedad conocida como “la Pudrición de la Corona” de plantas de espárrago causada por el hongo *Fusarium* spp. (conocida como FCRR por sus siglas en inglés). Con frecuencia para el control de estos problemas, los productores acostumbran realizar de tres hasta doce aplicaciones de pesticidas convencionales en un mismo ciclo; sin muchas veces tener éxito en el control y los problemas son reincidentes o se promueven otros de manera involuntaria.

El género *Fusarium* fue establecido por primera vez en el año de 1809 por Link (Takayuki et al., 2014 citado por Booth, 1977) basándose en la forma fusiforme de las conidias nacidas sobre un estroma. Martius en 1842 realizó los primeros estudios sobre los problemas que causa *Fusarium* spp. Sin

embargo, no fue hasta finales del siglo XIX cuando se estableció su importancia como causante de enfermedades en plantas. La complejidad implicada en la identificación de *Fusarium* spp. variará, dependiendo de la hospedera del cual el cultivo del hongo se ha originado y del grado de resolución que se requiera en dicha identificación. En este trabajo se busca realizar una identificación a nivel molecular del/los agentes causales de la pudrición de la corona del espárrago en la Región de Caborca, Sonora. Conocer el agente causal de una enfermedad es requisito indispensable para la toma de decisiones en el manejo del cultivo y/o para cualquier programa de prevención y/o manejo de enfermedades. Los estudios de ADN son demandantes con respecto a equipo, reactivos y experiencia técnica pero los resultados pueden ser obtenidos, aunque toman un poco más de tiempo y son más exactos que las identificaciones tradicionales usando claves pictóricas de identificación. Las limitaciones de este tipo de análisis molecular han sido costos, (el cual ha ido decreciendo rápidamente) y la disponibilidad de datos de secuenciación para las comparaciones necesarias en bancos de datos accesibles. En base a esto un laboratorio debe evaluar la necesidad del costo del trabajo extra contra la necesidad de la información adicional. En base a lo anterior, en este trabajo se busca identificar molecularmente el/los agentes causales de esta enfermedad en la región de Caborca, también se quiere establecer si existe una variabilidad cultural y/o morfológica que se pudiera usar como parámetro de identificación de las especies de *Fusarium* a nivel regional y por último se quiere determinar las condiciones óptimas (pH, temperatura, fotoperiodo) de desarrollo de los aislamientos regionales de *Fusarium* spp. a nivel de laboratorio para estudios futuros genéticos, de patogenicidad, control, etc. Con esta información se quiere esbozar un enfoque práctico para identificar las especies de *Fusarium*, presentes en la región de Caborca, en especial en relación con aquellas que afectan a las plantas. Sin embargo, los principios presentados aquí también pueden ser usados cuando se identifica *Fusarium* que se origina de otras fuentes o regiones y también pueden aplicarse al estudio de otros hongos.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Producción de espárrago

El interés sobre el espárrago en base a su valor nutricional, su sabor característico y la presencia de compuestos bióticos se ha visto incrementado últimamente. En el 2006 se estimó que existían 210,000 ha plantadas de este cultivo a nivel mundial (Weber *et al.*, 2001). China ocupa el primer lugar de productividad con aproximadamente el 84% de la producción mundial, la cual está mayormente dedicada al consumo interno. Se cultiva extensamente también en España (30%), Alemania (18%), Francia (15%), Italia (15%) y Grecia (14%) (Waskiewicz *et al.*, 2013).

En Latinoamérica, Perú es un importante productor el cual tiene las condiciones climáticas que le permiten producir durante todo el año y produce el 4% de la producción mundial. El cultivo del espárrago constituye una fuente de trabajo y entrada de divisas por las exportaciones del producto en México y dada la cercanía que tiene con los Estados Unidos, es el principal exportador de espárragos frescos a este país equivalente al 51% del total de las importaciones, superando a Perú que, en el 2010, era el principal exportador hacia Estados Unidos (Quilamba *et al.*, 2004; Godina, 2014).

En el año 2013, 3,654 millones de pesos se generaron al producirse 126 mil 420 toneladas provenientes de 17 mil 828 ha cosechadas en México. Las principales entidades productoras de espárrago en México son: Sonora, Baja California, Guanajuato, Baja California Sur y Querétaro en estos estados se concentra el 98.9% de la oferta, lo que equivale a aproximadamente 206 mil 225 toneladas. Sonora es el estado productor de espárrago más importante a nivel nacional al contribuir con el 69.4% del valor de la producción y aporta un volumen de 129 mil 808 toneladas. El valor comercial del cultivo de espárrago se estima en 6 mil 485 millones de pesos, lo que equivale a 24 mil ha sembradas (Godina, 2014). Caborca es la región principal en

producción de espárrago del Estado de Sonora, cuenta con más de 11 mil ha sembradas y es la más importante por las exportaciones hacia Estados Unidos. La producción de espárrago en la región genera numerosos empleos cada año, alrededor de 2 mil empleados en las empresas más grandes solo en periodo de cosecha (comunicación personal del productor José Manuel Figueroa). Del 2013 al 2016 la producción de espárrago creció de 125 mil toneladas a 208 mil 435 toneladas, lo que representa un aumento en términos reales del 66.5% a nivel nacional. Las exportaciones de México hacia Estados Unidos al cierre del 2015 alcanzaron 117.9 millones de dólares equivalentes a 106 mil 432 toneladas de espárrago (Godina, 2014).

## **2.2. El cultivo del espárrago (*Asparagus officinalis* L.)**

### **2.2.1 Características botánicas de la planta**

El espárrago es una planta herbácea, angiosperma, monocotiledónea de la familia Liliácea. Pertenece al género *Asparagus* spp. el cuál comprende 150 especies, de las que solamente el espárrago cultivado *Asparagus officinalis* L., se comercializa para el consumo humano y el resto de las especies son usadas como ornamentales. Está formada por dos partes, una parte subterránea compuesta por un rizoma y el sistema radical que en conjunto forman la corona y una parte aérea llamada helecho formada por los tallos erguidos (que pueden alcanzar hasta 1.5 m), por las ramas y también las hojas. Sobre el helecho se desarrollan las flores y los frutos. Presentan dos tipos de raíces: unas carnosas y gruesas y otras fibrosas, delgadas y cortas de las cuales emergen las raicillas o pelos absorbentes. La función de los pelos absorbentes es la absorción de agua y nutrientes, son muy abundantes durante la etapa vegetativa y disminuyen en la etapa reproductiva, pero es casi nula su presencia en la época de descanso. Las raíces carnosas perduran varios años, en cambio las fibrosas se renuevan anualmente. Las raíces carnosas tienen como función acumular reservas (hidratos de carbono, proteínas y minerales) que luego darán lugar al desarrollo de los tallos llamados también turiones (la parte comestible y comercial de este cultivo) hasta que estos emergen a la superficie del suelo.

El conjunto de raíces fibrosas, cilíndricas y yemas iniciales, forman una estructura irregular, que se extienden mientras la planta va alcanzando mayor edad, esta estructura es conocida como corona. En la corona se forman grupos de yemas vegetativas, las cuales se ubican en el ápice de crecimiento de donde se desarrollan los turiones. Esta estructura se utiliza como uno de los métodos para la propagación comercial de la especie (González, 1999; Fernández, 2015).

Desde el punto de vista nutricional, el espárrago es una hortaliza de muy bajas calorías, tiene un buen nivel de fibra, es rico en proteínas, vitaminas, calcio y hierro. Se sabe que el turión es buena fuente de antioxidantes como la luteína y caroteno. Tiene una cantidad significativa de protodioscina, diosgenina que reducen la toma de colesterol. El ácido fólico presente en el turión disminuye el peligro a cáncer de colon, enfermedades del corazón, de hígado y espina bífida. En suma, el espárrago contiene un sinnúmero de nutrientes importantes.

### **2.3. Factores limitantes de la producción de espárrago**

En la región de Caborca, año con año los productores de espárrago enfrentan diversos problemas fitosanitarios. Entre los que sobresalen la presencia de insectos dañinos, la infestación de malezas anuales y perennes, también la “Pudrición de Coronas” de plantas de espárrago causada por el hongo *Fusarium* spp. (conocido como FCRR por sus siglas en inglés). Con frecuencia para el control de estos problemas, los productores acostumbran a hacer de tres hasta doce aplicaciones de pesticidas convencionales en un mismo ciclo, pero muchas veces no se tiene éxito en el control, o bien el problema reincide o también se promueven otros problemas de manera involuntaria. El impacto por estos problemas se puede resumir en tres aspectos principales: existe un incremento de costos en un 20% o más por concepto de aplicaciones de agroquímicos, se corre riesgos de salud tanto para el productor como para el consumidor por la presencia de plaguicidas no autorizados o cuyo uso es limitado solo a una o dos aplicaciones anuales y por último la mayoría de las veces estos plaguicidas no tienen la selectividad

deseable y eliminan además de los organismos problema a otros organismos benéficos (Rivera, 2005).

La producción de espárragos (*Asparagus officinalis* L.) se ha visto cada vez más limitada a nivel mundial durante las pasadas décadas debido a problemas con la replantación de las esparragueras y el comienzo temprano de la declinación de las mismas (Morrison *et al.*, 2011; Molinero *et al.*, 2011; Hamel *et al.*, 2005). Grogan y Kimble citados por Morrison *et al.*, (2011) definieron en 1959 la declinación (llamado también decline o muerte regresiva) de los espárragos como "una disminución lenta en la productividad de plantaciones viejas de espárragos hasta el punto donde estas plantaciones se turnaron económicamente insostenibles". Estos autores también definieron el problema de la replantación como "la incapacidad para establecer plantaciones productivas nuevas donde las plantaciones han declinado". La declinación temprana de los espárragos puede llevar a una reducción en la vida útil de los campos plantados entre 5 y 8 años; los agricultores no pueden recuperar la inversión asociada al establecimiento de los campos de espárragos (Morrison *et al.*, 2011).

De acuerdo a diversos autores (Molinero *et al.*, 2011, Quilamba *et al.*, 1994), la podredumbre de la corona y la raíz, causada por *Fusarium* spp. es una limitante severa para la producción de espárragos (*Asparagus officinalis* L.) a nivel mundial. El desarrollo de FCRR en las plantaciones de espárragos tiene un impacto económico negativo como ya se comentó; además existen pérdidas económicas por los costos asociados con el establecimiento inicial de la plantación de espárragos, que se estima que es más de \$ 8,600 ha<sup>-1</sup>. Los rendimientos pueden disminuir de 2.22 a 3.03 kg ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> cuando una siembra está afectada por FCRR (Reid, *et al.*, 2001). Una plantación de espárragos es productiva solo un 50% de lo que era en la década de 1950, como resultado de la presencia de FCRR y otros patógenos tales como *Phytophthora asparagi*, así como por la autotoxicidad de los residuos de espárragos (Morrison *et al.*, 2011). Las plantaciones de espárragos pueden ser productivas por 15 años o más, dependiendo de la resistencia y el grado de infección por FCRR. La presencia de esta enfermedad en las plantaciones reduce notablemente la rentabilidad del cultivo. Las especies de *Fusarium* son ubicuas en los suelos donde causan el amortiguamiento de las plántulas

recién emergidas, el marchitamiento y las pudriciones de las coronas y raíces en diferentes cultivos (Hamel *et al.*, 2005).

#### **2.4. *Fusarium* y Metabolitos secundarios**

Los metabolitos secundarios son moléculas orgánicas de bajo peso molecular que no son esenciales para el crecimiento normal, pero proveen de ventajas selectivas en ciertos hábitats. Varían en estructura y en actividad biológica. Algunos son pigmentos, antibióticos, toxinas volátiles, proteínas extracelulares, otros son tóxicos a plantas y/o animales, otros regulan el crecimiento de plantas o tienen propiedades farmacéuticas y otros incluyendo algunos de *Fusarium* spp. contribuyen a la patogenicidad del hongo (Li-Ju *et al.*, 2013). *F. oxysporum* y *F. proliferatum* son de los patógenos más severos en espárrago y son también conocidos como productores de micotoxinas, principalmente del tipo de las fumonisinas y moniliforminas. *F. proliferatum* puede producir una variedad de micotoxinas como la moniliformina, beauvericina y la Fumonisina B1 (asociada con leucoencefalomalacia en caballos, edema pulmonar en cerdos, hepatocarcinoma en ratas, a la inhibición de la síntesis de esfingolípidos y al incremento del riesgo de cáncer esofágico en humanos), mientras que *F. oxysporum* se reconoce como productora de moniliformina (toxina asociada con la enfermedad de Keshan) (Waskiewicz *et al.*, 2013).

Existe la preocupación de que ciertas especies de *Fusarium* puedan producir micotoxinas en el turión. Nigh *et al.*, citado por Elmer (2000) reportó que no se encontraron fumonisinas B1, B2 ó B3 en turiones colonizados con *F. proliferatum*, originarios de México o California. Por el contrario Logrieco *et al.*, 1999 reportaron la presencia de fumosinas B1 y B2 en tejidos de coronas y tallos de espárrago en Italia. No existen estudios locales a nivel regional en Caborca sobre este aspecto. Durante los últimos 20 años ha quedado claro que cada especie de hongo tienen un perfil específico de metabolitos secundarios los cuales podrían ser integrados en el sistema de clasificación taxonómica (Thrane, 2001).

## 2.5. Formas saprófitas

En distintos suelos de diferentes regiones del mundo se ha encontrado un gran número de formas no patogénicas de *F. oxysporum*. Estas formas se caracterizan por desarrollarse en forma saprófita en las raíces de algunas plantas, pero sin ocasionar ningún tipo de enfermedad en las plantas que las albergan (Nelson *et al.*, 1983). Las razas no patogénicas representan un componente mayoritario de la microbiota fúngica de los suelos agrícolas y el estudio de su diversidad es importante si queremos entender la diversidad entre las razas virulentas (Correll, 1991). Miembros saprofíticos de *F. oxysporum* comúnmente colonizan raíces necróticas como invasores secundarios y son fácilmente aislados y por lo tanto frecuentemente y erróneamente se asume son la causa primaria de la necrosis. Estos aislamientos necesitan ser probados con respecto a su patogenicidad antes de concluir sobre su papel en la enfermedad (Leslie *et al.*, 2006).

## 2.6. *Fusarium* como un patógeno oportunista en humanos

Las infecciones oportunistas por *Fusarium* en humanos y animales son relativamente raras, generalmente son bastante resistentes a los antimicóticos. *Fusarium oxysporum* ha sido asociado a infecciones en la córnea, varios tipos de dermatitis, heridas por quemaduras e infecciones internas tanto sistémicas como localizadas. *F. oxysporum* ha sido encontrado contaminando sistemas de agua en hospitales lo cual puede crear un reservorio del hongo para infecciones por varios años. El hongo ha sido introducido a pacientes vía catéteres contaminados. Este hongo puede ser un problema serio para pacientes con VIH o pacientes que han recibido trasplante de órganos mayores. *F. oxysporum* y *F. proliferatum* no fueron patogénicos en ensayos experimentales con ratones inmunocomprometidos. Hay al menos un caso reportado de la muerte de un paciente humano inmunocomprometido y de otras infecciones en pacientes tanto inmunocomprometidos y no inmunocomprometidos. *F. proliferatum* es resistente a la mayoría de los antimicóticos y menos resistente a la amphotericina B y al posaconazole (Leslie *et al.*, 2016). Todas las especies de

*Fusarium* patógenas a humanos producen estados microconidiales y muchos producen “biofilms” sobre las superficies de plomería (Li-Jun *et al.*, 2013). Lo podemos encontrar en alimentos almacenados donde frecuentemente producen toxinas y contaminan estos alimentos. Tiene muchos mecanismos de supervivencia, uno de ellos es la capacidad de cambiar rápidamente de manera morfológica y fisiológica para adaptarse a un nuevo ambiente por lo que pueden sobrevivir en un amplio rango de sustratos y han sido aislados de alimentos preservados, e incluso químicos almacenados (como en tanques de gasolina de aviones). El interés predominante en este género ha sido y sigue siendo su papel como agente causal de enfermedades en plantas (Booth, 1977).

## 2.7. Pudrición de la Corona

Diferentes especies de *Fusarium* se encuentran en diferentes regiones del mundo, por ejemplo, en los países bajos, *F. culmorum* (W.G. Sm.) Sacc. está asociado con FCRR, mientras que *F. proliferatum* y *F. oxysporum* están ausentes. En Sudáfrica Schreuder *et al.*, (1995) reportó *F. oxysporum*, *F. proliferatum* y en menor extensión *F. solani* como los hongos predominantes responsables de la declinación de nuevas plantaciones de espárrago. Es probable que *F. subglutinans* (Wollenw. & Reinking) juegue un papel menor en el FCRR de América del Norte, ya que es aislado menos frecuentemente de las plantas de espárragos. En los Estados Unidos, los patógenos primarios asociados a FCRR son *F. proliferatum* (teleomorfo *Gibberella fujikuro*) y *F. oxysporum* f. sp. *asparagi*, el cual infecta principalmente la región del tallo de la corona y raíces, respectivamente. *Fusarium oxysporum* está implicado en infectar y causar FCRR en el sistema de raíces de espárragos, aunque también ha sido aislado de otras partes de la planta de espárragos (González, 1999; Morrison *et al.*, 2011). En el sur de España, *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* S.I. Cohen, *Fusarium proliferatum* (Matsush.) Nirenberg y *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. son los patógenos más frecuentemente aislados asociados con la enfermedad (Molinero *et al.*, 2011).

En Guanajuato, México, tres especies de *Fusarium* fueron asociadas con FCRR, *F. oxysporum* (59% de la frecuencia de los aislamientos), *F.*

*moniliforme* (30%) y *F. solani* (11%) (Quilambaqui-Jara *et al.*, 2004). De acuerdo a Hamel *et al.*, en 2005, la enfermedad en espárrago es causada por un complejo de especies de *Fusarium*, incluyendo *F. proliferatum* (T. Matsush.) Nirenberg, *F. culmorum* (W.G. Sm.), *F. oxysporum* (Schlenchtend): Fr. f. sp. *asparagi* Cohen & Heald, y *Fusarium. redolens* Wollenw. f. sp. *asparagi* Baayen. Elmer (2000) estableció en estudios de postcosecha la frecuencia de infección de *Fusarium* spp. en turiones de espárrago, vendidos en Connecticut y producidos localmente y en el extranjero. Tres especies distintas fueron asociadas con la pudrición de la corona y la raíz y con problemas de post cosecha: *F. oxysporum* Schlechtend.:Fr emend. Snyder & Hans., *F. proliferatum* (T. Matsushima) Nirenberg, y *F. verticillioides* (Sacc) (syn. *F. moniliforme* J. Sheld. Emend. Snyder & Hans.). Este mismo autor reportó también que en estudios de turiones cosechados en California y México, la fuente de inóculo eran las coronas infectadas en el campo. Otras especies como *F. redolens* Wollenweb (Sacc.) fueron identificadas, causando la mancha del turión por *Fusarium*, pero esta enfermedad es distintivamente diferente a los problemas de post cosecha que se mencionan anteriormente.

El clima y edad de la planta puede influenciar la composición de las especies de *Fusarium* spp. sobre el turión. En climas cálidos *F. proliferatum* es la especie dominante sobre espárrago, pero ésta especie puede estar ausente en climas más fríos y templados. Nigh *et al.*, citado por Elmer (2000) reportó una incidencia de infección más baja causada por *F. proliferatum* en turiones cosechados de campos más al norte en California que en los campos de México. Conforme las plantaciones de espárrago envejecen la incidencia de *F. proliferatum* tiende a incrementarse, mientras que *F. oxysporum* es más prevalente en plantaciones más jóvenes. Otros factores que pueden gobernar la incidencia de *Fusarium* spp. sobre los turiones son el tiempo y temperatura de almacén. Los turiones infectados decaen más rápido en climas cálidos que los turiones no infectados. *F. proliferatum* es capaz de crecer sobre un turión durante su almacenamiento a 26°C, aunque Guerrero *et al.*, (1997) no encontró correlación entre el área de producción y la incidencia de la infección por *Fusarium* spp. de turiones, es razonable pensar que cargamentos de regiones más cálidas toman más tiempo en llegar a mercados del norte y

pueden tener una mayor incidencia de *F. proliferatum* que turiones cosechados en áreas locales (Elmer, 2000).

### 2.7.1 Sintomatología de FCRR

Los síntomas en general de FCRR, incluyen marchitamiento, enanismo, clorosis, necrosamiento del tejido vascular, muerte de los puntos de crecimiento y secadera de plántulas. El patógeno se propaga hacia la corona de forma basípetala, causando la muerte prematura de la planta frecuentemente. Los síntomas de la infección se observan generalmente a mediados del verano y la infección de *Fusarium* spp. puede dar por resultado la destrucción completa de las raíces de alimentación y el marchitamiento de las raíces de almacén. El daño de FCRR puede ser exacerbado por la exposición a agentes virales, los residuos alelopáticos del espárrago, el estrés ambiental y daño por insectos el cuál sirve como sitio de entrada para la infección por *Fusarium* spp. Los síntomas de FCRR que se observan en la planta del espárrago pueden variar ligeramente dependiendo de las especies de *Fusarium* spp. que estén presentes (González, 1999; Morrison *et al.*, 2001).

Los síntomas subterráneos observados, varían también con la especie. En el caso de *F. oxysporum* f. sp. *asparagi*, se observa una necrosis del sistema vascular de la raíz, la cual tiene una coloración rojiza o café, en estados avanzados. *F. moniliforme* y *F. proliferatum* producen síntomas parecidos pero el primero se ha encontrado relacionado con la muerte de la corona, la cual adquiere una tonalidad café rojiza en su interior, acompañada de muerte de yemas, la planta afectada deja de producir brotes a pesar de que el resto de las raíces primarias y secundarias se observan sanas. *F. proliferatum* se puede encontrar afectando las coronas, pero con mayor frecuencia produce lesiones en los tallos, estos se observan cloróticos y con manchas cafés oscuras, deshidratados, huecos y con lesiones estriadas extensivas a lo largo de la parte subterránea del tallo. Estas dos últimas especies reducen la producción de turiones y tallos drásticamente hasta llegar a cero, *F. solani* produce pudriciones superficiales de raíces primarias, secundarias, coronas y tallos, aunque menos grave que las especies anteriores (González, 1999; Molinero *et al.*, 2011).

## 2.8. Aislamiento de especies de *Fusarium*

Debido a la capacidad de *Fusarium* spp. para cambiar rápidamente, la identificación de especies presenta ciertos problemas, algunos son más imaginarios que reales, pero la reputación que tiene de complejidad hace que se ejerza esta tarea con cuidado (Booth, 1977). La mayoría de los fitopatólogos en algún punto de su carrera se ven ante la necesidad de identificar un cultivo de *Fusarium* spp. la complejidad de este problema varía, dependiendo de la hospedera del cual el cultivo se origina y del grado de resolución que sea requerida en la identificación. Las especies de *Fusarium*, como ya se mencionó anteriormente causan enfermedades en un amplio rango de hospederas. El hongo puede originarse del suelo, aire o ser acarreado en los desechos de una planta y puede ser recobrado de cualquier parte de la planta, que va desde la raíz más profunda hasta de la flor más alta. Además de esto, la taxonomía de *Fusarium* spp. ha estado plagada de conceptos cambiantes sobre el número de especies que pueden variar de 9 especies hasta más de 1000 especies reconocidas por varios taxónomos durante los pasados 100 años dependiendo en el concepto de especie que es utilizado (Summerell *et al.*, 2003).

Las especies de *Fusarium* pueden ser invasores primarios o secundarios. Es común encontrar algunas especies en el suelo y es raro encontrar una raíz necrótica en un suelo agrícola que no esté colonizada por al menos una especie de este hongo. En muchos casos erróneamente se asume que una especie de *Fusarium* es el agente causal de la enfermedad porque frecuentemente se aísla este hongo a partir de raíces, coronas y tallos necróticos. Muchas especies de *Fusarium* tienen la habilidad de colonizar tejido como invasores primarios o secundarios dependiendo del sustrato. La mayoría de las especies crecen rápido en medios de cultivos, pero hay un importante número de patógenos que crecen lentamente en medio de cultivo lo que los hace a veces difíciles de aislar (Nelson, *et al.*, 1983).

### 2.8.1 Aislamiento a partir de tejido enfermo de plantas

Como fitopatógeno *Fusarium* spp. emplea un sinnúmero de estrategias de infección. La mayoría puede ser clasificada como hemibiótrofos ya que durante la infección primaria parece que el patógeno depende de la hospedera viva, pero eventualmente comenzará a causar la muerte de la hospedera y a consumir las células para así convertirse en necrotrófico. Las enfermedades causadas por *Fusarium* spp. pueden comenzar en las raíces a partir de inóculo del suelo o de partes de la planta que están sobre la superficie del suelo, o bien de inóculo que se disemina por el aire o agua (Li-Jun *et al.*, 2013).

La selección de los procedimientos de aislamiento de *Fusarium* spp. depende de la naturaleza de las muestras de la planta, el número de muestras y de las especies de *Fusarium* que se sospecha están involucradas. Los aislamientos pueden estar acompañados de una sola muestra o unas cuantas muestras colectadas en un momento determinado o bien puede involucrar muchas muestras colectadas durante muestreos sistemáticos para una enfermedad en particular por algunos ciclos de crecimiento de la hospedera. La forma más común para aislar las especies de *Fusarium* es cultivando el material vegetal colonizado en medio de agar. Si el patógeno produce esporodoquio en la superficie del tejido de la planta, el esporodoquio puede ser removido y usado para preparar una suspensión de esporas en agua estéril. Las especies de *Fusarium* en cuestión pueden entonces ser aisladas usando técnicas de cultivos monospóricos para obtener cultivos puros. Si se producen peritecios fértiles sobre el tejido vegetal, un pequeño pedazo de tejido con peritecio se lava bien, se remueve el exceso de agua y el pedazo de tejido con el peritecio se coloca en el lado interior (se puede usar vaselina para mantener el tejido en su lugar) de una caja petri invertida con agar agua o agar hojas clavel. La caja Petri se incuba en condiciones de alta humedad relativa y pasadas las 24 horas de incubación, las ascosporas se liberan y caen a la superficie del agar donde germinan y producen colonias. El hongo puede ser transferido a otro medio mediante la transferencia de una sola espora o la punta de una hifa a una nueva caja Petri con medio.

Las especies de *Fusarium* que son lentas para crecer puede ser que sean difíciles de aislar directamente de tejido necrosado el cual es extensamente colonizado por otros hongos y bacterias. Sin embargo, estas especies pueden algunas veces ser aisladas usando una combinación de técnicas cebo/siembra. Una vez que el tejido necrótico ha sido lavado extensivamente, se corta en pequeños pedazos los cuales se vuelven a lavar. Estos pedazos de tejido necrótico son mezclados con suelo esterilizado. Semillas de la planta involucrada son plantadas en esta mezcla de suelo e incubadas bajo condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad. Las plantas son muestreadas una vez que las lesiones en la raíz se desarrollan y el tejido enfermo se cultiva en un medio adecuado después de ser lavado y desinfectado. Este procedimiento ha sido usado exitosamente para aislar *F. avenaceum* de raíces necróticas viejas de trébol subterráneo (Nelson *et al.*, 1983).

Como se mencionó anteriormente, el aislamiento de especies de *Fusarium* a partir de plantas enfermas en agar es uno de los métodos usados más comunes. El tejido seleccionado debe ser el más característico del material enfermo en estudio. Áreas de tejido que muestran áreas necróticas avanzadas deben evitarse porque este tejido es más propenso a ser colonizado por microorganismos secundarios. Las muestras de tejido deben ser tratadas con un desinfectante superficial para reducir el número de microorganismos secundarios que pueden crecer sobre el agar y con esto aumentar la oportunidad de aislar el microorganismo primario. El hipoclorito de sodio (comercial) es un desinfectante químico adecuado para usarse en la mayoría de los tejidos. Las concentraciones de hipoclorito de sodio usadas más comúnmente varían en el rango de 1 al 5% y el tiempo de exposición también varía de acuerdo a la naturaleza del tejido. El tejido tratado con el desinfectante debe ser secado con un papel absorbente previamente esterilizado antes de ser colocado en el medio de cultivo para reducir la contaminación por bacterias. Las raíces secundarias muy delgadas, son algunas veces muy pequeñas para ser esterilizadas por lo que pueden ser lavadas en agua corriente por algunas horas y después ser enjuagadas en varios cambios de agua destilada estéril, secadas y colocadas en un medio de cultivo (Nelson *et al.*, 1983).

## 2.9. Medios de cultivo para aislar *Fusarium* spp.

El aislamiento de las especies de *Fusarium* debe hacerse en medios bajos en nutrientes. Los medios naturales usan material vegetal como paja de trigo, de cebada, de chícharo y semillas embebidas en agar agua. El Agar-clavel (Apéndice B) también puede ser usado, así también el medio selectivo de Nash-Snyder (Apéndice G) el cuál es útil para aislar *Fusarium* spp. de material vegetal, especialmente si este, está en malas condiciones o infestado con contaminantes. Otro medio usado es la modificación de Czapek-Dox en el cuál las colonias de *Fusarium* spp. muestran más coloraciones en este medio que en el medio Nash-Snyder. *Fusarium* spp. también puede ser aislado a partir de suelo usando el método de dilución o bien cultivándolo en restos orgánicos en un medio selectivo, pueden ser aislados indirectamente de suelo usando un método de raíz-cebo o cebos estériles como pedazos de paja estéril (Nelson *et al.*, 1983). Se han desarrollado diferentes medios específicos para aislar *Fusarium* spp. los más tradicionales son el Peptona PCNB (PPA) y el Komada. Este último, es usado cuando el objetivo es aislar *F. oxysporum* mientras que el PPA es un medio básico suplementado con fungicidas y antibióticos (estreptomina y neomicina), por lo que inhibe el crecimiento de muchos hongos y bacterias, pero permite el crecimiento lento de *Fusarium* spp. La mayoría de las especies de *Fusarium* no forman colonias distintivas en PPA. Frecuentemente se observa una esporulación pobre y una morfología de colonia anormal. Esto significa que las colonias tienen que ser sembradas para realizar una identificación definitiva. Aunque la esporulación es pobre existen suficiente número de esporas para poder realizar cultivos monospóricos. Los cultivos no deben dejarse por un periodo mayor de 2 a 4 semanas en este medio. El medio Komada, tiene entre sus ingredientes un antibiótico y Oxgall (hiel de buey fresca) es un agente selectivo para el aislamiento de microorganismos Gram (-). Este medio se desarrolló para aislar en forma selectiva a *F. oxysporum* del suelo. Las colonias de *Fusarium oxysporum* son distintivamente pigmentadas en este medio de cultivo. El crecimiento de otras especies de *Fusarium* puede ser suprimido en este medio, por lo que no se le considera una buena opción para recuperar

comunidades de *Fusarium* que contengan otras especies además de *F. oxysporum*.

### **2.9.1 Agar verde de Malaquita (MGA)**

El medio agar verde de malaquita, fue desarrollado en 1997 y es una alternativa al uso de PPA o Komada. La diferencia básica entre este medio y PPA es que el PCNB se substituye por el verde de malaquita (2.5 ppm). Se ha reportado que el MGA inhibe el crecimiento de contaminantes como *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp. sin reducir el número de colonias de *Fusarium* spp. La concentración de verde de malaquita es importante ya que se ha observado concentraciones de 15-50 ppm inhiben la germinación de esporas de *Fusarium* spp.

### **2.9.2 Agar Jugo V-8**

Este medio es comúnmente usado para inducir la formación del estado sexual de *Fusarium* spp. También es usado para mantener cultivos vegetativos. Existen variantes de la receta tradicional (Apéndice D). Estas variaciones se refieren al hecho de agregar CaCO<sub>3</sub> (y cuanto agregar) al medio y si el pH se tiene que ajustar, para cruza fértiles el agar V-8 es bueno, pero para las cruza que son menos fértiles, el agar zanahoria es más consistente y más productivo (Leslie *et al.*, 2006). Para la mayoría de las investigaciones genéticas, los investigadores usan agar zanahoria y agar Jugo V-8 para producir peritecios de los cuales se colectan las ascosporas.

## **2.10. Cultivos monospóricos**

El estándar para sembrar/inocular una caja Petri con medio de cultivo, ya sea para reproducir y/o identificar *Fusarium* spp., es usar una sola espora germinada del hongo. En realidad, no tiene mucha importancia si se trata de una microconidia o macroconidia, es más importante que sea a partir de un solo núcleo. Durante la germinación de las esporas, se localiza un área donde se observe una espora en forma aislada germinando, se corta un bloque de

agar que tiene la espora germinada y se transfiere al medio de cultivo con el que se va a trabajar ya sea SNA o PDA. El bloque de agar se coloca en una caja petri, con CLA en un área cercana a un pedazo de hoja de clavel de manera que tanto el pedazo de hoja como el WA se colonicen rápidamente (Booth, 1977; Leslie, *et al.*, 2006).

El suelo y muchas plantas suelen albergar numerosas especies de *Fusarium*. En algunos casos, estas especies pueden distinguirse en PPA (Peptona-PCNB agar, llamado también Nash-Snyder Agar), pero en general las colonias deben ser subcultivadas en otros medios de cultivo antes de la identificación de manera que se eliminen otros microorganismos “acompañantes”. En base a esto, los cultivos monospóricos son necesarios para asegurarse que solo una raza/cepa está siendo caracterizada, ya que existen muchas fuentes de *Fusarium* spp. que contienen cepas genéticamente diferentes y especies diferentes. Así la variación de los caracteres morfológicos observables se reduce grandemente. Para estudios genéticos, tanto de poblaciones de campo y/o cruces de laboratorio, el origen uninucleado del cultivo es crítico ya que las diferencias genéticas no son necesariamente morfológicamente obvias. El tiempo invertido para obtener cultivos puros y monospóricos por lo general es altamente retribuido, al tener así una mayor certeza y claridad en las identificaciones y/o al reducir la necesidad de reevaluar los resultados o volver a realizar experimentos cuando los resultados obtenidos se explican como el resultado de cultivos mixtos. Asumiendo que puede existir una distribución aleatoria de especies/cepas en la muestra, entonces la muestra también debe ser de buen tamaño y representativa. Frecuentemente los muestreos se hacen con la finalidad de comparar diferentes localidades por lo que es útil en estos casos tomar muestras en jerarquías. El nivel más pequeño sería una planta o una lesión de ella, de ahí se progresa a un campo, población, municipio, estado, etc. (Choi *et al.*, 1999; Booth, 1977; Leslie *et al.*, 2006).

### **2.11. Medios de cultivo para el crecimiento e identificación de *Fusarium* spp.**

Una vez aislado y purificado *Fusarium* spp. a partir de la muestra de tejido enfermo, existen diferentes medios de cultivo que han sido usados en

forma estándar para reproducir (o subcultivar) e identificar especies de *Fusarium*, las cuales pueden presentar fenotipos notoriamente variables cuando se cultivan en diferentes medios. Las características morfológicas que son características en ciertos medios de cultivo, no se observan o se alteran cuando la misma “raza/cepa” se cultiva en un medio diferente. El principio básico es usar el mismo medio usado por los investigadores que lo identificaron, los medios de cultivo más comúnmente usados son el agar con hoja de clavel (CLA), Agar Spezieller Nährstoffarmer (SNA) y el agar papa-dextrosa (PDA).

### **2.11.1 CLA**

Es un medio natural que se prepara colocando, asépticamente pedazos (3-5 mm<sup>2</sup>) de hoja de clavel (previamente secados y esterilizados) en cajas petri en agar agua 2% estéril (Apéndice B). Generalmente un pedazo de hoja de clavel se agrega por cada 2 mL de medio. Las hojas de clavel se preparan de material fresco, libre de fungicidas y plaguicidas, estas se cortan con una navaja estéril, se secan en un horno a 70°C por 3-4 horas (hasta que se hacen quebradizas). Las hojas también se pueden secar en el microondas por irradiación de rayos gama (2.5 megarads). Las hojas esterilizadas se pueden almacenar en seco a temperatura ambiente hasta por 12 meses, la mayoría de las especies esporulan en CLA de 6 a 10 días. Las macroconidias desarrolladas en CLA son más uniformes en tamaño y forma que en cultivos que se desarrollan en PDA o CZAPEK-Dox. Las macroconidias se forman primariamente en esporodoquios, los cuales usualmente se desarrollan sobre los pedazos de hoja y se usan para la identificación ya que son más consistentes en forma y longitud que las macroconidias que se producen sobre fiálides, las macroconidias son más comunes en las hifas que crecen sobre el medio, frecuentemente lejos de las hojas de clavel.

El modo de formación de las microconidias ya sea a partir de monofiálides o de polifiálides, la presencia de cabezas falsas o cadenas de microconidias, así como la presencia de clamidosporas (Figura 4) puede ser determinada por un examen directo usando un microscopio compuesto a 100x, cuando los aislamientos en las cajas petri la colonia alcanza 60 mm de

diámetro en CLA. Este medio también es útil cuando se requiere una producción alta de conidias (para experimentación), aunque muchos investigadores también usan el medio modificado de Czapek-Dox para este fin. En cultivos donde hay mezcla de especies heterotálicas de *Fusarium* se pueden formar peritecios cuando los cultivos se incuban bajo la luz, las hojas de clavel más viejas pueden dar mejor resultado que las hojas de clavel jóvenes para la formación de estos peritecios.

### **2.11.2 Agar Spezieller Nährstoffarmer (SNA)**

Es un agar nutritivo débil usado para la identificación y mantenimiento de razas de *Fusarium* spp. y *Cylindrocarpon* spp. (Apéndice G). Una vez preparado el agar, se colocan pedazos de papel filtro estéril (Whatman No. 1) de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> sobre el agar solidificado para incrementar la esporulación, la degeneración del cultivo que es común en muchos medios sintéticos usualmente no ocurre con SNA. El medio promueve la esporulación y un buen desarrollo celular de células conidiógenas, pero debido a que la formación de esporodoquios es limitado, la morfología de la microconidia no es tan uniforme o confiable como en CLA. En algunos casos microconidias formadas en SNA difieren morfológicamente de aquellos observados en CLA. Muchas cepas de *Fusarium* spp. también forman clamidosporas más fácilmente en SNA que en CLA, por lo que para especies donde la morfología de la microconidia o la presencia de clamidosporas son criterios importantes de identificación de cultivos en CLA y SNA deben ser observados. SNA es transparente, por lo que los cultivos pueden observarse directamente con un microscopio compuesto (100x) colocando un pequeño cubito de agar sobre un portaobjetos y una gota de agua destilada estéril y colocando un cubreobjetos para ser observado a 100x (Leslie *et al.*, 2006).

### **2.11.3 PDA**

Es un medio rico en carbohidratos (Apéndice F). La formación de conidias en este medio no es muy consistente en tamaño y forma como lo es en CLA o SNA por lo que no es tan confiable para la identificación; Sin

embargo, la morfología de la colonia, pigmentación y tasas de crecimiento son razonablemente consistentes. Si los cultivos se inician de inóculo estándar y se incuban bajo condiciones estándar estas características de la colonia pueden ser usadas como criterios secundarios de identificación. El PDA es usado por algunos investigadores para el aislamiento de especies de *Fusarium*, pero tiene el inconveniente de muchas especies de *Fusarium* saprófitos y bacterias pueden crecer en el medio e interferir con el aislamiento, si PDA se usa para el aislamiento del hongo a partir del material vegetativo enfermo, entonces la concentración de la papa y dextrosa debe reducirse 50-75% y se debe incluir un antibiótico de amplio espectro para inhibir crecimiento bacteriano.

## **2.12. Medios de identificación suplementarios**

### **2.12.1 Agua agar 2% (WA)**

Consiste de agar en agua destilada (Apéndice A) este medio se recomienda para germinar conidias para iniciar cultivos monospóricos, en este medio el crecimiento de las hifas es escaso, lo que facilita que se puedan tomar puntas de las hifas para iniciar nuevos cultivos, algunas veces el escaso crecimiento en WA facilita el aislamiento de especies de *Fusarium* de material vegetativo, especialmente raíces. Para producir cadenas de microconidias más largas y abundantes, se pueden agregar 4-8 g/L KCl a WA o a CLA, con esto las cadenas son más fáciles de observar, el agua agar se puede preparar también a una concentración de 0.05% para preparar diluciones seriadas de suelo.

### **2.12.2. Agar suelo (SA)**

Este medio favorece la formación de clamidosporas. La cantidad de suelo (Apéndice H) utilizada en este medio varía con el tipo de suelo usado, se ha observado que cuando se usan suelos oscuros ricos en materia orgánica se producen clamidosporas abundantes en varias especies de

*Fusarium*, pero también se producen bien las clamidosporas usando otros tipos de suelo.

### 2.12.3. Agar KCI

En este medio (Apéndice E) *Fusarium* spp. produce cadenas más largas de microconidias. Las cadenas de microconidias son más fáciles de observar, ya que hay menor humedad sobre la superficie del agar y menos gotas de agua en el medio aéreo (Leslie *et al.*, 2006.).

### 2.13. El género *Fusarium* spp.

*Fusarium* spp. es un género amplio de hongos filamentosos y cosmopolitas que viven como saprofitos, de vida libre en el suelo o como patógenos de una gran variedad de plantas (González, 1999). *Fusarium* spp. pertenece al orden de los Hypocreales y es polifilético. En la Figura 1 se muestra la clasificación de *Fusarium* (Lin-Ju, *et al.*, 2013).

Reino: Hongos
División: <i>Ascomycota</i>
Subdivisión: <i>Pezizomycotina</i>
Clase: <i>Sordariomycetes</i>
Orden: <i>Hypocreales</i>
Familia: <i>Nectriaceae</i>
Género: <i>Fusarium</i>

Figura 1. Clasificación de *Fusarium* (Lin-Ju, *et al.*, 2013).

Las características morfológicas son base para la identificación y taxonomía de *Fusarium* spp. Sin embargo, las especies en el género varían significativamente tanto morfológicamente como fisiológicamente, algunas de

estas variaciones es una respuesta a diferencias en el medio ambiente, como medio de cultivo, temperatura, y luz. La identificación de especies usando manuales como guías requieren que las colonias de *Fusarium* spp. crezcan en medios de cultivo específicos y bajo condiciones específicas. Cualquier desviación al seguir estos requerimientos resultarían en errores importantes cuando se identifica usando caracteres morfológicos como base. Las colonias de *Fusarium* spp. cultivadas con el objetivo de extraer ADN son mucho menos sensibles a las diferencias de cultivo. Las identificaciones morfológicas de *Fusarium* están basadas en características observadas en algunos de los tres medios de cultivo CLA, PDA o SNA (Leslie *et al.*, 2006). Algunas especies de *Fusarium* producen esporas meióticas (sexuales) y hasta tres tipos de esporas mitóticas (asexuales). Sin embargo no se sabe si todos los tipos de esporas son producidas por todas las especies (Figura 2, 3 y 4).

Los Esporodocios conteniendo macroconidias se forman más rápido sobre las hojas de clavel y las microconidias usualmente son más abundantes en las porciones donde la colonia crece sobre la superficie del agar. Muchos *Fusarium* spp. patógenos de plantas, incluyendo *Fusarium oxysporum* Schlechtend.:Fr. f. sp. *vasinfectum* (Atk.) Snyder & Hans., producen clamidosporas tras la muerte del huésped (Nelson, 1981). Las clamidosporas presentan una pared gruesa, son producidas asexualmente y persisten en el suelo hasta que encuentran a una hospedera. A pesar de que las clamidosporas son el propágulo primario del suelo de *F. oxysporum*, las conidias se usan frecuentemente en ensayos de patogenicidad, ya que se producen fácilmente en forma masiva, pero para estudios sobre supervivencia las clamidosporas no deben ser sustituidas por las conidias ya que estas pueden ser menos resistentes que las clamidosporas bajo condiciones ambientales adversas. Se han descrito varios métodos para la producción de clamidosporas en el laboratorio los cuales tienen limitaciones y la producción no es rápida ni en grandes cantidades. Algunos métodos citados por Bennett *et al.*, (2013) adecuados para la producción en pequeña escala, son los que utilizan filtros de exclusión de tamaño, el método del talco estéril, medios hechos a partir de extractos de apio o subproductos agrícolas, medios con componentes sintéticos acidificados, el método de agar suelo y los métodos de caldo de suelo. La producción de clamidosporas ocurre en CLA, SA y SNA.

En CLA las clamidosporas se forman generalmente entre 2 y 4 semanas después de la inoculación, en SA se forman entre los 10 y 14 días si se incuban en la oscuridad, en SNA aparecen entre 2-3 semanas después de la siembra y se debe inocular en la luz u oscuridad a 25°C. Cultivos para la formación de clamidosporas cultivados en CLA o SNA se inician generalmente a partir de cultivos monospóricos (Leslie *et al.*, 2006; Lin- Ju *et al.*, 2013).

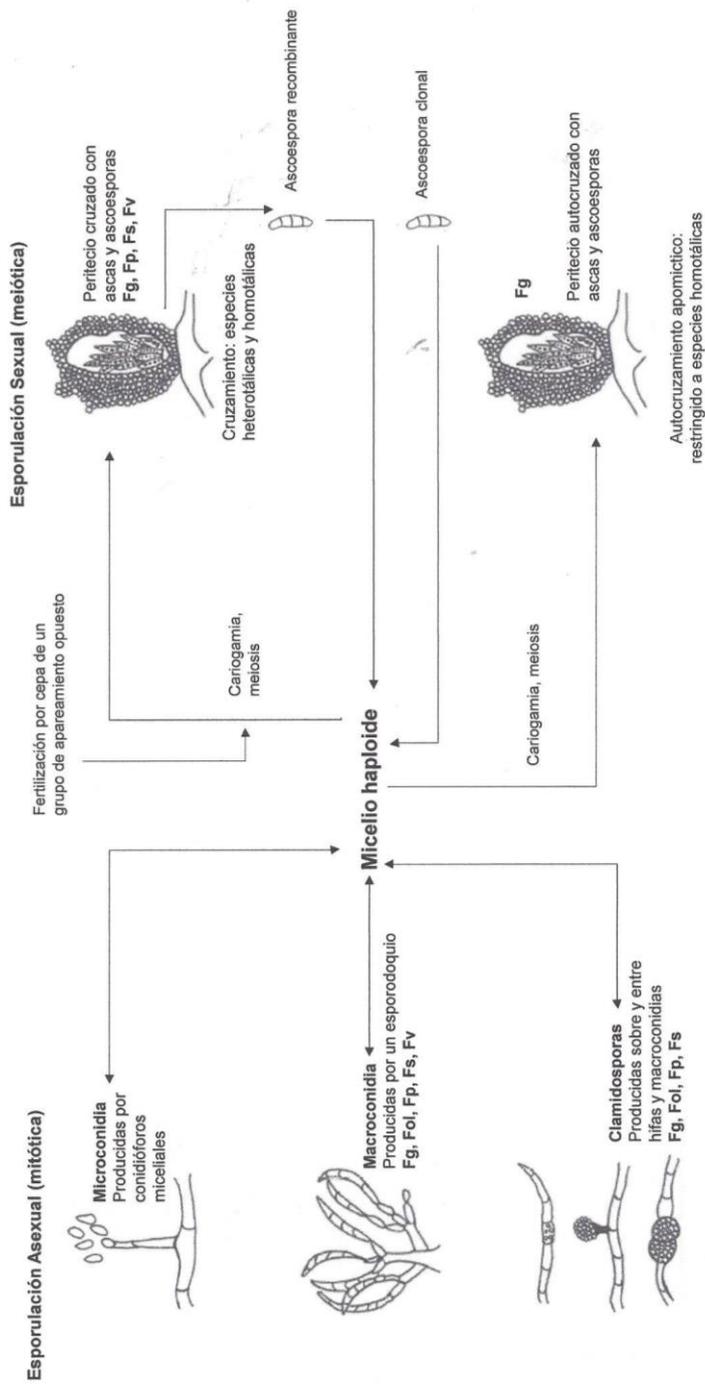


Figura 2. Ciclo de vida generalizado de *Fusarium*. El organismo crece como una colonia de hifas haploide, excepto por un corto estado dicariótico y diploide (cada célula contiene 2 núcleos haploides paternos) anteriores a la meiosis y a la producción de ascosporas (esporas sexuales) haploides. Las ascosporas se producen en grupos de 8 en una asca (saco) contenidos en una estructura en forma abotellada (peritecio). Las especies homotálicas son capaces de autofertilizarse, produciendo una progenie de ascosporas clonales (apomixis); especies heterotálicas se autoesterilizan. Tres formas principales de esporas mitóticas (asexuales) pueden producirse dependiendo de las especies. **(Arriba a la izquierda)** Esporas asexuales pequeñas (microconidias), se producen del micelio de estructuras formadoras de esporas sencillas (conidióforos). **(En medio a la izquierda)**, esporas largas en forma de canoa, septadas (macroconidias) se producen en agregados de conidióforos en forma de almohadilla llamado esporodocio y/o sobre conidióforos en micelio aéreo. **(Abajo a la izquierda)** Esporas de resistencia con

### 2.13.1. Pigmentación de *Fusarium*

Los pigmentos de *Fusarium* spp. no son meramente subproductos del hongo, tienen un papel en las actividades enzimáticas del microorganismo. Los trabajos de aislamiento de estos pigmentos comenzaron desde 1904. Entre 1930 y 1940 muchos trabajos sobre pigmentos de este género fueron realizados en la London School of Hygiene and Tropical Medicine (Booth, 1977).

La variación en el color de *F. oxysporum* depende de la producción de carotenoides y naftoquinonas, la naturaleza química de los pigmentos de *Fusarium* spp. se entiende solo en algunas especies; Rubrofusarin  $C_{15}H_{12}O_5$  (metilxantona), Aurofusarina  $C_{30}H_{20}O_{12}$  (altamente insoluble en agua) y culmorina  $C_{15}H_{26}O_2$  son tres pigmentos de *Fusarium culmorum* que han sido identificados, otros pigmentos como javanicina, bostrcoidin, solanione y licopersina se han aislado de *F. solani* y *F. oxysporum*. Análisis cromatográficos del pigmento del micelio de *F. nivale* consiste de naranja, rojo, amarillo y dos componentes de carmina. Su presencia ayuda a su separación de otras especies de *Fusarium* en cereales, en la sección Martiella se aislaron y purificaron en 1947, 1949 y 1950, pero se desconoce qué condiciones favorecen la producción de estos pigmentos (Carlile 1956).

La formación de pigmentos en relación a la luz varía en diferentes especies. *F. decemcellulare* desarrolla pigmentos más conspicuos en la oscuridad que en la luz, aunque en la mayoría de las especies la luz es importante para la formación de pigmentos. *Fusarium* también puede formar pigmentos en un amplio rango de pH. Para propósitos de identificación comparativos el pH del medio debe ser entre 6-7 para que la pigmentación sea adecuada (Booth, 1977).

### 2.13.2. Genoma de *Fusarium* spp.

El genoma de *Fusarium* spp. está compartimentalizado en regiones llamadas genoma central y genoma adaptativo. Los genes de la primera región son responsables del metabolismo primario y reproducción, mientras que el adaptativo es responsable de virulencia del patógeno, especificidad de

hospedera y otras posibles funciones (Lin- Ju, *et al.*, 2013). Existe un alto grado de similitud morfológica entre *F. proliferatum* y *F. oxysporum*. Avances en la reacción en cadena de la polimerasa y los métodos genómicos hacen posible identificar correctamente *F. proliferatum* y *F. oxysporum* utilizando secuencias de genes de calmodulina (Morrison *et al.*, 2011).

### 2.13.3. Formae speciales (F. sp)

Las formae speciales son cepas fisiológicas que son indistinguibles de las cepas saprofitas de la misma especie pero muestran diferentes propiedades fisiológicas en su habilidad para parasitar hospederas específicas. Inicialmente se creía que las formae speciales eran específicas a una hospedera y entonces el nombre se tomaba de la hospedera, por ejemplo *betae*, *apii* y otras 60. Este concepto temprano respecto a una patogenicidad altamente selectiva dio lugar al establecimiento de muchas F. sp.; las cuales son meramente razas de formae speciales descritas para otros hospederos. Por ejemplo *F. oxysporum* f. sp *raphani* y f. sp *mathio* de rábano y “stocks” respectivamente son razas de *F. oxysporum* f. sp *conglutinans* que ataca la coliflor.

*Fusarium* tiene distintas formae speciales. Una formae special es una agrupación en la cual las cepas no se pueden diferenciar por su morfología o por las características de las colonias, pero fisiológicamente son diferentes por la capacidad que tienen para parasitar y causar enfermedad en cierto tipo de hospederas, es decir, cada formae special tiene su hospedera específica la cual otra formae no puede causar enfermedad, ya que cada hospedera cumple con sus necesidades nutricionales específicas (Nelson, 1981; Correll, 1991).

Estudios recientes de compatibilidad vegetativa, de diversos marcadores moleculares y de secuencias génicas de la fusariosis, indican que las poblaciones de dichos patógenos tienen estructura clonal pero la diversidad genética que presentan es mayor que la que se puede explicar debido a su reproducción estrictamente sexual. Así que, aunque algunas formae speciales de *F. oxysporum* son monofiléticas (p.ej., *albedinis*, *canariensis*, *ciceris*), la gran mayoría son polifiléticas, es decir, han adquirido

la patogenicidad en eventos independientes y múltiples (p.ej., *asparagi*, *cubense*, *dianthi*, *lycopersici*, *melonis*, *vasinfectum*), de manera que los linajes clonales que la componen contienen uno o más grupos de compatibilidad vegetativa (VCG) y una o más razas patogénicas. En las formae especiales polifiléticas las razas patogénicas se pueden originar de poblaciones parasíticas no patogénicas (como *vasinfectum*), otras razas pueden estar relacionadas filogenéticamente pero otras tienen orígenes independientes (p. ej., *cubense*) y por último una misma raza puede tener origen independiente en unos casos y en otros derivar de otra raza preexistente (p.ej., *lycopersici*) (Jiménez-Díaz, 2006).

Existen excepciones en las que una formae especial puede parasitar más de una hospedera, como en el caso de la formae especial *vasinfectum* es tal vez la única formae especial mencionada en la literatura que puede atacar algunas plantas pertenecientes a diversas familias botánicas como son algodón, tabaco, soya y alfalfa (Armstrong y Armstrong, 1978). Snyder y Hansen en 1940 reconocieron 25 F. sp. de *Fusarium oxysporum*, mientras que Booth en 1971 registró 70 F. sp., Armstrong y Armstrong en 1981 reconocieron 72 formae especiales patógenas de cultivos de gran importancia económica.

Miembros de complejos de especies de *Fusarium oxysporum* son capaces de causar marchitez en más de 100 especies de plantas agrónomicamente importantes. Sin embargo, aislamientos individuales de *F. oxysporum* frecuentemente tienen una alta especificidad hacia cierta hospedera. Los aislamientos que son patogénicos a la misma hospedera están agrupados en la misma formae especial (p.ej. *F. oxysporum* F. sp. *lycopersici* para patógenos de tomate o *F. oxysporum* f. sp. *asparagi* que infecta al espárrago (Li-Jun *et al.*, 2013). *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* es un hongo ubicuo en el suelo que puede sobrevivir en residuos de raíces de espárragos durante más de 25 años. Aparentemente tiene una gama de huéspedes más amplia que otras formae especiales de *F. oxysporum*. También se ha reportado la susceptibilidad del espárrago a otras formae especiales de *F. oxysporum* (Molinero *et al.*, 2011).

#### 2.13.4. Taxonomía de *Fusarium* spp.

Este género incluye cerca de 300 especies identificadas filogenéticamente, las cuales en su mayoría no tienen nombres formales, los estudios filogenéticos sugieren que *Fusarium* spp. se originó aproximadamente hace 91.3 millones de años, indicando que su diversificación coincide con la de las angiospermas. Los linajes más tempranos están asociados con plantas leñosas como parásitos, endófitas o saprófitos (Li-Jun *et al.*, 2013).

Desde que FCRR se describió por primera vez en 1959 *Fusarium* spp. ha sido sometido a una extensa revisión taxonómica, fue descrito originalmente como *F. moniliforme* J. Sheld. En 1983, *F. moniliforme* fue taxonómicamente dividido en *F. proliferatum* y *F. subglutinans*. Por otra parte, *F. oxysporum* Wollenw. se identificó originalmente como uno de los agentes causales de FCRR por Cohen y Heald en 1941 y posteriormente fue agrupados en formae speciales basadas en subconjuntos de aislamientos que pueden infectar cultivos hospederos específicos, sin embargo, *F. oxysporum* f. sp. *asparagi* también puede ser patogénico a otros cultivos, como el apio (*Apium graveolens* L.) y la cebolla (Morrison II *et al.*, 2011).

El género *Fusarium* fue establecido por primera vez en el año de 1809 por Link (Takayuki *et al.*, 2014 citado por Booth, 1977) basándose en la forma fusiforme de las conidias nacidas sobre un estroma. Martius en 1842 realizó los primeros estudios sobre los problemas que causa *Fusarium* spp. Sin embargo, no fue hasta finales del siglo XIX cuando se estableció su importancia como causante de enfermedades en plantas.

Los estudios de la patogenicidad de *Fusarium* spp. en plantas se publicaron entre 1892 y 1899 (Booth, 1977). Muchos autores han tratado de establecer un sistema para definir el género. Este género está dividido en secciones y una sección es usada para géneros con un gran número de especies con características morfológicas similares. Dentro de las especies existen poblaciones identificadas y no identificadas con muchas variaciones, lo que dificulta establecer un sistema taxonómico aceptable.

Wollenweber y Reinking (1935) citados por Nelson (1991) publicaron un amplio trabajo sobre la taxonomía de *Fusarium* spp. el cual es una

referencia estándar en esta materia y todos los sistemas de taxonomía de *Fusarium* spp. publicados desde 1935. Comenzaron con 1000 nombres de especies organizadas en 16 secciones y las cuales contenían 65 especies, 55 variedades y 22 formas. Los caracteres usados por Wollenweber y Reinking para separar las secciones (agrupaciones de especies relacionadas según Booth, 1977) fueron la presencia o ausencia de microconidias, la forma de la microconidia, la ausencia o presencia de clamidosporas, la localización terminal o intercalar de las clamidosporas, la forma de la macroconidia y la forma de las células basales de la macroconidia (Fig. 2 y 3). Booth (1997) estableció que *Fusarium* es un género con esporas asexuales hialinas, septadas y cuya célula basal lleva una característica en forma de tacón. En el año de 1982 Gerlach, Nirenberg y Nelson *et al* (1983) desarrollaron un sistema taxonómico basándose en las características morfológicas permitiendo distinguir entre especies de una forma segura. Nelson, *et al.*, (1983) desarrollaron su propio sistema de taxonomía combinando partes de muchos otros sistemas para que las identificaciones de *Fusarium* spp. fueran menos complejas. El número de especies se redujo, las variedades y las formas fueron combinadas con las especies apropiadas. Este trabajo está ilustrado con fotografías de macroconidias, microconidias, conidióforos y clamidosporas producidas en medio de hojas de clavel. El sistema de Nelson, Toussoun y Marasas es el más utilizado por su fácil manejo y en él propone la existencia de 12 secciones que agrupan todas las especies del género. En la tabla 1 se muestra el sistema taxonómico de Nelson, Toussoun y Marasas describiendo las 12 secciones que proponen (Nelson *et al.*, 1983).

Tabla 1. Sistema taxonómico de 12 secciones propuesto por Nelson, Toussoun y Marasas (Nelson *et al*, 1983).

Sistema Taxonómico		
No. Sección	Nombre	Género y Especie
1	Eupionnotes	<i>F. cavispermum</i> , <i>F. melanochlorum</i>
		<i>F. tabacinum</i> , <i>F. epistroma</i>
2	Macroconia	<i>F. buxicola</i> , <i>F. sphaeriae</i>
		<i>F. coccophilum</i> *, <i>F. gigas</i>
3	Submicrocera	<i>F. ciliatum</i> *
4	Pseudomicrocera	<i>F. coccidicola</i> *
5	Arachnites	<i>F. stoveri</i> , <i>F. larvarum</i>
6	Roseum	<i>F. detenonianum</i>
7	Gibbosum	<i>F. arthosporum</i>
8	Discolor	<i>F. heterosporum</i> , <i>F. reticulatum</i> , <i>F. sambicinum</i>
		<i>F. culmorum</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. crookwe</i>
		<i>F. flocciferum</i> *, <i>F. sublunatum</i> *, <i>F. tumidum</i> *
9	Lateritum	<i>F. lateritum</i> , <i>F. xylarioides</i> *
10	Liseola	<i>F. moniliforme</i> , <i>F. proliferatum</i>
		<i>F. amulatum</i> *, <i>F. succisae</i>
11	Elegans	<i>F. oxysporum</i> , <i>F. udum</i> *
12	Martiella	<i>F. solani</i>

## 2.14. Sección Elegans

Las características de esta sección está representada por *F. oxysporum* var. *redolens*. Los cultivos son pálidos, color salmón, rosáceo vivaz, violeta en medios a pH 6.5-7. El micelio es estriado, de aterciopelado a flooso; las macroconidias siempre presentes en forma unicelulares o bicelulares; elípticas (nacen lateralmente de la hifa) alantoides y crecen sobre fiálides simples laterales o sobre fiálides producidas de conidióforos laterales cortos, ramificados. El término fiálide fue inventado por Vuillemin en 1910, miembro de una escuela de micólogos franceses, entre los cuales el uso de rasgos evolutivos en la taxonomía de los deuteromicetos se remonta a Costantin (1888) y se refiere a la rama que sirve de apoyo inmediato a los conidios. A menudo toma la forma de un matraz con una parte globosa y un cuello, que recuerda a un basidio con una sola espora y su esterigma. La palabra basidio debe reservarse para el órgano característico de los basidiomicetos, la rama de conidióforos en forma de frasco o matraz tomó el nombre de fialide. La típica fiálide forma conidios exclusivamente en la parte superior de su cuello. A veces se agota en la producción de un solo conidio, a veces produce varias sucesivas y en dirección basípetala. Éstas pueden desprenderse a medida que se producen, permanecer en una masa aglutinada o formar pequeñas cadenas que se mantienen juntas durante un período mayor o menor. La presencia de una fiálide proporciona la característica taxonómica más confiable después de la presencia de conidios (Minter *et al.*, 1983). Las macroconidias son falcatas, presentan de 3 a 5 septas cuando el cultivo es maduro, las macroconidias se forman inicialmente de fiálides laterales ramificadas pero después se forman de esporodoquios. Las clamidiosporas son intercaladas o terminales en ramificaciones laterales cortas, pueden presentarse en forma solitaria, en pares, en cadenas. Son abundantes, hialinas, con pared rugosa o lisa (Booth, 1977) (Figura 2).

*Fusarium oxysporum* fue la primera de 9 especies descritas en la sección Elegans en 1913. Además de ser el miembro económicamente más importante y variable. Ésta variación puede expresarse como una serie de razas/cepas, las cuales pueden ser razonablemente estables. Además de la dificultad para separar estas especies especialmente después de mantenerlas

en un medio artificial por algún tiempo, gradualmente se dieron cuenta que la patogenicidad selectiva de *Elegans*, no estaba necesariamente asociada a la variación morfológica designada por el nombre de una especie como “*vasenfectum*”. De hecho casi cualquiera de estas razas/cepas pueden acarrear las capacidades específicas del patógeno para un hospedero particular, apariencia cultural estaba más relacionada a consideraciones ecológicas y geográficas que a verdaderos caracteres de las especies. Su micelio es delicado blanco o color durazno pero usualmente con tinte morado, de escaso a abundante y después floccoso, se vuelve aterciopelado y algunas veces rugoso en cultivos más viejos.

La microconidia nace sobre fíalides simples que emergen lateralmente de la hifa o de conidióforos cortos escasamente ramificados. Las microconidias son generalmente abundante, de forma variable oval-elipsoide, cilíndrica, recta o curvada con dimensiones de 5-12×2.2-3.5µm. Las macroconidias son escasas en algunas cepas, nacen de conidióforos ramificados más complejos o sobre esporodoquios parecidos a *Tubercularia* spp. Tienen paredes delgadas, de 3-5 septas. Fusoides-subulate y en punta en ambos extremos. Ocasionalmente fusoides-falcados macroconidias se encuentran con ápices en forma de gancho y base pedicelada. Una macroconidia de 3 septos puede medir de 27-46 × 3-5 µm, de 5 septos 35-60 × 3-5 µm y de 6-7 septos 50-66 × 3.5-5µ. La espora de 3 septos es la que se encuentra más comúnmente (Fig 8).

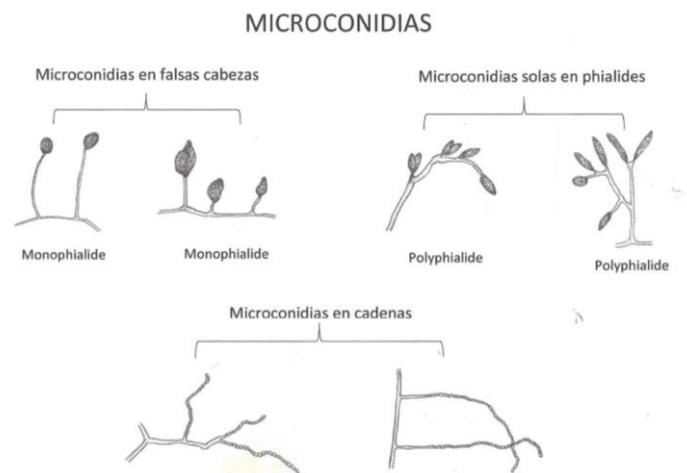


Figura 3. Monofíalides, polifíalides, falsas cabezas y cadenas de microconidias de *Fusarium* spp. (Modificado de Leslie *et al.*, 2006) Dibujo: Cid G. Ambar.

#### **2.14.1. *Fusarium oxysporum* Schlecht. Emend Snyder and Hans**

*Fusarium oxysporum* es cosmopolita, pertenece a la sección Elegans y ha sido reportado toxigénico. Habita en el suelo como saprofito de vida libre o patógeno, pero puede ser encontrado en las raíces de las plantas, en las hojas y tallos y es una de las especies de mayor importancia fitopatológica ya que es una de las que cuenta con mayor número de plantas hospederas (Nelson *et al.*, 1983).

Elmer en 2011 citado por Morrison *et al.*, (2011) cuestionó el estado monofilético de *F. oxysporum*, y estudios recientes demostraron que *F. oxysporum* es de hecho polifilético. *Fusarium oxysporum* puede infectar raíces jóvenes de alimentación en forma asintomática, entrando por el punto donde emergen las raíces de alimentación entre las células epidérmicas. Posteriormente, el hongo se mueve dentro de las células, irradiándose intercelularmente para colonizar el tejido vascular, consecuentemente los síntomas comienzan a desarrollarse tanto en la parte aérea como en la subterránea de la planta (Srivastava *et al.*, 2011). Las lesiones pequeñas, rojizas y elípticas se desarrollan en las puntas de la raíz alimentadora y a lo largo de la misma. Estas lesiones pueden también ser evidentes en la parte subterránea del tallo de la planta. Se piensa que *Fusarium oxysporum* se asocia con las dificultades en el establecimiento de los campos recién plantados, mientras que *F. proliferatum* se piensa que afecta a plantaciones más viejas y por lo tanto juega un papel clave en el decline temprano de los espárragos (Morrison *et al.*, 2011; Li- Jun, *et al.*, 2013). *F. oxysporum* se puede dispersar por diferentes medios como viento, suelo, semilla o material vegetativo infectado (Leslie *et al.*, 2006). *Fusarium oxysporum* f. sp *asparagi* puede sobrevivir sobre residuos de espárrago hasta por 25 años. Aparentemente tiene un más amplio rango de hospederos que otras formae especiales de *F. oxysporum*, se ha reportado que el espárrago es también susceptible a otras formae speciales de *F. oxysporum* (Molinero- Ruiz *et al.*, 2011).

**2.14.2. Descripción Morfológica:** La mayoría de los aislamientos producen abundantes esporodoquios anaranjado pálido, sin embargo en muchos otros

aislamientos puede ser que estos sean escasos o inexistentes. Produce microconidias abundantes, generalmente uniceluladas, de forma oval a forma arriñonada y se producen solamente en cabezas falsas en micelio aéreo. Las macroconidias son abundantes su forma varía de una ligera forma de hoz, largas y fusiformes a un poco rectas, poseen de tres a cinco septas transversales, tienen una pared fina y delicada, una célula apical atenuada y una célula basal en forma de pie, generalmente presentan 3 septos. Se forman de monofialides sobre conidióforos ramificados en esporodoquios y en menor proporción de monofialides de las hifas. Pueden encontrarse en forma escasa en algunas razas o cepas pero son generalmente abundantes en esporodoquios y ocasionalmente crecen de hifas sobre la superficie del agar. Presenta conidióforos tanto ramificados como no ramificados en monofialides. Las monofialides que soportan las microconidias son cortas cuando se comparan con las producidas por *F. moniliforme* y *F. solani*. Las clamidosporas están presentes y se desarrollan en forma aislada o en pares, en la mayoría de los aislamientos se forman fácilmente y abundantemente en el cultivo, especialmente en clones saprofíticos, pero su producción puede ser lenta (4-6 semanas) en algunos aislamientos. También las podemos encontrar en agregados o cadenas cortas. Pueden ser terminales o intercalados en micelio aéreo, o sumergido en hifas sobre la superficie. La apariencia de la pared puede ser rugosa o lisa. El estado perfecto no se conoce. En PDA el crecimiento de la colonia es rápido y el micelio aéreo blanquecino puede teñirse morado o puede verse inundado de un color azul debido a los esclerocios cuando estos están presentes o por un color crema, marrón o anaranjado cuando los esporodoquios son abundantes. En algunas cepas los esporodoquios son anaranjados, discretos y rebosantes, la superficie inferior del medio puede ser de incolora a azul oscuro o morado oscuro y estos colores pueden ser visible a través del micelio cuando se observa desde arriba.

Las características más distintivas son la presencia de clamidosporas y microconidias que nacen en cabezas falsas sobre monofialides cortas. Los cultivos de *F. oxysporum*. frecuentemente se parecen a los de *F. subglutinans*, pero estos últimos tienen microconidias nacidas de polifialides y las clamidosporas están ausentes. En PDA *F. oxysporum* se puede parecer a las

especies de la sección Liseola. *Fusarium oxysporum*. tiene muchos clones que presentan una gran variedad de características en PDA, además de esto mutan frecuentemente en cultivo, a formas que progresivamente son más miceliales con un incremento de micelio aéreo y una disminución de esporodocios, esclerocios, color o a formas pinotales en las cuales el micelio aéreo es deprimido y la macroconidia nace en pinotes lo que le da al cultivo una apariencia húmeda, y una coloración de amarillo a anaranjado (Nelson *et al.*, 1983; Leslie *et al.*, 2006).

## 2.15. Sección Liseola

### 2.15.1. *Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg

*Fusarium proliferatum* se describió primero como *Cephalosporium* spp. por Matsushima. Morfológicamente *F. proliferatum* y *F. fujikuroi* no pueden ser diferenciados efectivamente en base solo a morfología ya que son especies hermanas. En PDA se parece mucho a *F. oxysporum* pero *F. proliferatum* tiene microconidias en cadena y *F. oxysporum* tiene microconidias en falsas cabezas y clamidosporas (Leslie *et al.*, 2006). Pertenece a la sección Liseola, es cosmopolita, está distribuido mundialmente en una gran variedad de sustratos agrícolas. Causa enfermedades en maíz, sorgo, mango y espárrago y ha sido reportado como toxigénico (Nelson *et al.*, 1983). Es omnipresente y pasa el invierno como micelio en coronas dormantes y residuos de espárragos, también se puede encontrar en tallos y residuos de maíz (*Zea mays* L) los cuales pueden ser fuentes de inóculo. *Fusarium proliferatum* infecta y coloniza una amplia gama de especies de plantas, incluyendo el espárrago, se ha identificado que especies de *Fusarium* patogénico a los espárragos pueden colonizar raíces y causar síntomas en especies de plantas frecuentemente cultivadas en estrecha proximidad o en rotación con espárragos en el sur de España. El ajo mostró ser hospedera sintomática para *F. solani* y *F. oxysporum formae special asparagi* y *F. proliferatum*. Se observó colonización de *F. oxysporum formae special asparagi*, *F. proliferatum* y *F. solani* en ajo, maíz, cebolla, trigo, papa y girasol lo que sugiere que son reservorios de *F. oxysporum* *F. sp asparagi*, *F. proliferatum* y

*F. solani* de espárrago y demuestra la importancia de la rotación de cultivos en el desarrollo FCRR (Molinero-Ruiz *et al.*, 2011).

**2.15.2. Descripción morfológica:** Su estado sexual es *Giberella intermedia* (Kuhlman). Las microconidias son abundantes, usualmente uniceluladas y base plana y el otro extremo cilíndrico. Microconidias en forma de pera también se pueden observar, pero son raras. Las microconidias se originan en cadenas que varían de longitud y en cabezas falsas. Las macroconidias son abundantes, pueden tener ligeramente una forma de hoz o ser casi rectas, con superficies dorsales y ventrales paralelas en la mayor parte de la longitud de la macroconidia, las paredes son finas y delicadas y la célula basal tiene forma de pie. Presenta monofialides y polifialides ramificadas y no ramificadas, no hay presencia de clamidosporas. En PDA *F. proliferatum* se parece a *F. oxysporum*. El micelio blanco aéreo crece rápidamente y algunas veces se tiñe de morado. Los esporodoquios pueden estar presentes o ausentes; cuando están presentes pueden tener un color que va de marrón a anaranjado, los esporodoquios pueden estar en forma confluyente en pseudopinotes o en forma discreta. Esclerocios se pueden desarrollar y frecuentemente son de color azul oscuro; pueden ser tan abundantes que le da a la colonia una coloración azul sobre y por debajo de la superficie, el área por debajo de la superficie puede ser incolora o morado oscuro.

Las características más distinguibles son las microconidias se forman en cadenas sobre polifialides y la presencia de polifialides separa a *F. proliferatum* de *F. moniliforme*. Las cadenas de *F. proliferatum* sobre las polifialides frecuentemente parecen tener una forma de "V" (Figura 2) cuando se observa a bajos aumentos en el microscopio. La longitud y el número de cadenas de microconidias pueden variar grandemente entre cultivo y cultivo. En algunos casos pueden ser raras y consistir de únicamente en cadenas de 3 conidias, sin embargo, estas son cadenas y no falsas cabezas. *Fusarium proliferatum* varía en cultivo presentando formas pinotales donde el micelio aéreo es reprimido y reemplazado por láminas de macroconidias que le dan al cultivo un color amarillento y de apariencia húmeda o bien el micelio se forma y el esporodoquio y color de la colonia son suprimidos o eliminados (Nelson, *et al.*, 1983).

## 2.16. Factores asociados a la presencia de *Fusarium* spp.

En contraste con la universalidad de *Fusarium* spp. en los suelos, la incidencia de FCRR es generalmente localizada y esporádica, esto sugiere que existen un conjunto de condiciones ecológicas que influyen en el desarrollo de la enfermedad. Estudios previos han relacionado infecciones de FCRR con la presencia de ácidos fenólicos liberados por la planta de espárrago, a la represión de reductores de magnesio en el suelo y a varias condiciones fisicoquímicas del suelo. La información sobre las condiciones ecológicas asociadas con la expresión de FCRR es escasa. El pH bajo del suelo y la textura fina de este, así como el drenaje inadecuado favorecen la presencia de esta enfermedad, en estudios citados por Hamel *et al.*, (2005), sobre las condiciones ecológicas asociadas con plantaciones de espárragos sanos e infestados como la alta materia orgánica del suelo, la alta capacidad de retención de agua y a veces el alto contenido de arcilla se asoció con una baja incidencia de la enfermedad excepto cuando el drenaje era pobre. En el mismo estudio, el magnesio (Mg) parecía ser el único nutriente deficiente en los campos infestados y esta condición se asoció con una elevada proporción de potasio K:Mg. De acuerdo con Nonnecke citado por Hamel *et al.*, (2005), los sitios propicios tenían un pH del suelo bajo. La enfermedad FCRR en el espárrago parece ser provocada por varios factores relacionados con el suelo los cuales pueden tener un impacto negativo en el crecimiento de las plantas, que podrían actuar independientemente o sinérgicamente. A nivel de laboratorio López y López (2004) encontraron que los valores óptimos de pH para el crecimiento de las especies de *Fusarium* se encontraron entre 5.5 y 6.5.

Las plantas de espárragos debilitadas por tensiones relacionadas con nutrientes, agua, cosecha u otros factores pueden ser más susceptibles a la infección, pero ciertas condiciones ecológicas también pueden conducir a una mayor agresividad de las poblaciones nativas de *Fusarium* spp. Se sabe que el cloruro de sodio (NaCl) reduce la gravedad del FCRR y se propuso que el efecto positivo del NaCl se debió a una estimulación mediada por plantas de bacterias reductoras de manganeso (Mn), lo que a su vez, aumenta la disponibilidad de Mn del suelo en los suelos de las plantaciones de

espárragos. La aplicación de NaCl dio como resultado un aumento de Na y una disminución de las concentraciones de Mg y Ca en los tejidos de los espárragos, lo que sugiere que el efecto del NaCl también podría ser fisiológico. Sin embargo, en un experimento de raíz dividida, la supresión de la enfermedad fue más fuerte cuando se aplicó NaCl; esto sugiere que el impacto del NaCl no es o no sólo es mediado por la planta, sino que también está mediado por el suelo, aunque la cantidad de NaCl utilizada es aparentemente demasiado baja para tener actividad fungicida (Hamel *et al.*, 2005).

### **2.17. Manejo de la enfermedad causada por especies de *Fusarium***

La mayoría de los estudios se han centrado en *F. oxysporum*. Han sido muchos los intentos de limitar FCRR a través de métodos culturales, fungicidas y de control biológico, que incluyen el uso de especies de *Fusarium* no patógenas, el uso de NaCl para salinizar el suelo, el uso de micorrizas arbusculares, la incorporación de residuos de raíces de espárragos; desinfección biológica del suelo; mediante la utilización de fungicidas, como Benomyl, tiofanato-metilo y fludioxonil; mediante el empleo de antibióticos de *Streptomyces griseus*; y por último mediante el desarrollo de resistencia genética contra *Fusarium* spp. por selección de gametofitos. Estas medidas han mostrado niveles de eficacia variables.

De los experimentos examinados, la gran mayoría se dirigen a *F. oxysporum*. Hay muy pocos estudios que han estudiado específicamente *F. proliferatum*, el principal agente implicado actualmente en la declinación temprana del espárrago. Esto es probablemente debido al alto grado de similitud morfológica entre *F. proliferatum* y *F. oxysporum*. Avances en la reacción en cadena de la polimerasa y los métodos genómicos hacen posible identificar correctamente *F. proliferatum* y *F. oxysporum* utilizando secuencias de genes de calmodulina.

Las prácticas de manejo más ampliamente examinadas incluyen la salinización y el uso de especies de *Fusarium* no patogénico para competir con *Fusarium* spp. patogénico. La salinización con NaCl es significativamente mejor que el empleo de especies no patogénicas de *Fusarium*. La salinización

solía ser una práctica estándar entre los esparragueros para controlar las malezas en el siglo XIX y principios del siglo XX, pero cayó en desuso con el advenimiento de los herbicidas modernos para el control, de las malezas. Las consecuencias a largo plazo de los campos salinizados puede ser un cambio en el pH del suelo, en la salinidad y otros parámetros importantes para el rendimiento de las plantaciones de espárragos. Reid *et al.*, citados por Morrison III *et al.*, (2011), reportaron que dos aplicaciones anuales de NaCl a un campo de producción comercial en Michigan, no afectaron significativamente los niveles de pH, potasio, magnesio, o calcio, ni aumentó la salinidad en el suelo a 15 cm. Sin embargo, las aplicaciones de NaCl aumentaron la salinidad en el suelo a 5.4 mS m<sup>-1</sup> en una mayor profundidad (15-30 cm). La mayoría de los estudios en los que NaCl redujo con éxito la severidad de FCRR se llevó a cabo en invernaderos, cámaras o pequeñas parcelas de campo. La investigación de la parcela fue en las plantaciones de espárragos con severos problemas de declive, a pequeña escala, no comercial y no puede representar la producción comercial. Cuando se llevaron a cabo ensayos con sal en campos comerciales en Michigan, no hubo aumento en el rendimiento de espárragos. También se observó que el NaCl exacerba la pudrición de la corona y raíz causada por *Phytophthora* spp. el cual es un patógeno importante en espárragos en Michigan y California. Como resultado de estos factores, la salinización no es una estrategia recomendada para *Fusarium* spp.

Otro método cultural que se ha investigado es la desinfestación biológica del suelo, esta se ha utilizado para manejar *F. redolens* Wollenw. con resultados positivos. Este proceso requiere que los productores escarben el suelo a una profundidad de 80 cm para depositar recortes de césped y posteriormente cubrir/sellar todo el campo con plástico. Ya que este método no se ha intentado para controlar otras especies de *Fusarium* y es laborioso, se necesita más investigación antes de que se puedan hacer recomendaciones concluyentes.

El control biológico también ha sido investigado para el control de FCRR. Esto se ha realizado utilizando *Fusarium* spp. no patógenas. En el pasado se ha invertido mucho para generar cultivares de espárragos resistentes a *Fusarium* spp. Sin embargo, esto no se ha producido un cultivar

comercial viable. Una alternativa prometedora a largo plazo para combatir la FCRR implica el uso de la selección de gametofitos de plantas de espárragos resistentes a *Fusarium* spp. fungicidas específicos, fumigantes y un antibiótico redujo notablemente FCRR, particularmente el tiofanato-metilo, Metam - potasio, Telone C - 35 (Dow AgroSciences, Indianápolis, IN), y faeriefungin. Los fungicidas y fumigantes no se han usado ampliamente para reducir FCRR, pero ensayos de campo están en curso, el desarrollo y pruebas adicionales de compuestos fungicidas dirigidos a *Fusarium* spp. beneficiarían a los productores. En la región de Caborca los productores de esparrago aplican Carvendazin (2-metaxicarbamoil-bencimidazol) (0.5-1.0 kg/ha, Metiltiofanato (4,4-(*o*-fenileno)bis(3-tioalofanato) de dietilo), Tecto 60 (2-tiazol-4-il-1H-bencimidazol) aproximadamente 1 vez al mes durante la etapa de desarrollo de la planta ( aproximadamente 5 aplicaciones al año), con un costo aproximado de \$350-650 por ha (comunicación personal M.C. Rivera Orduño B., asesor técnico de la región).

El estrés es un factor importante en la promoción del FCRR en espárrago. Los suelos arenosos, que son predominantes en muchas regiones esparragueras, especialmente en Michigan, son muy porosos y no retienen agua, lo cual puede conducir a condiciones de estrés hídrico. Investigaciones sobre métodos y tiempo de riego para así reducir el estrés para los espárragos podría reducir consecuentemente la severidad de FCRR.

Los esparragueros dependen de herbicidas para el control de malezas, especialmente en las plantaciones jóvenes. Los productores muestran preocupación hacia herbicidas específicos y sus efectos negativos sobre el crecimiento del helecho de espárragos. Se realizaron ensayos de invernadero para evaluar el efecto de ciertos herbicidas sobre el crecimiento de los espárragos, y la aplicación de mesotriona resultó en una reducción en el peso de la corona. Pruebas de campo revelaron que la mesotriona puede ser fitotóxica para los espárragos y podría causar menores rendimientos. Investigaciones futuras deben investigar como ciertos manejos (incluidos los herbicidas) afectan el vigor de las plantas de espárragos y la progresión de FCRR. En general, una estrategia eficaz para combatir FCRR debería incluir un enfoque multidimensional que incluye fungicidas, selección continua para resistencia contra *Fusarium* spp., y ciertas técnicas culturales como evitar los

herbicidas que son fitotóxicos para los espárragos y riego para evitar el estrés ambiental en los espárragos (Morrison *et al.*, 2011).

### 3. JUSTIFICACIÓN

En la región de Caborca, año con año los productores de espárrago enfrentan diversos problemas fitosanitarios. Entre los que sobresalen la presencia de plagas, la infestación de malezas anuales y perennes y también enfermedades. Entre las enfermedades más limitantes de la producción de este cultivo esta la pudrición de coronas de plantas de espárrago causada por el hongo *Fusarium* spp. Con frecuencia para el control de estos problemas, los productores acostumbran a hacer de tres hasta doce aplicaciones de pesticidas convencionales en un mismo ciclo; sin muchas veces tener éxito en el control, lo que causa que los problemas sean reincidentes o que se promuevan otros de manera involuntaria.

La complejidad implicada en la identificación de *Fusarium* spp. varía, dependiendo de la hospedera del cual el cultivo se originó y del grado de resolución que se requiere en dicha identificación. En este trabajo buscamos realizar una identificación molecular del/los agentes causales de la pudrición del corona del espárrago en la Región de Caborca, Sonora. Conocer esta información es requisito indispensable para la toma de decisiones en el manejo del cultivo y/o para cualquier programa de prevención y/o manejo de enfermedades para los agricultores. A nivel de gabinete, muchas de las veces el diagnóstico se hace en base a características morfológicas y culturales primarias y secundarias del hongo por cuestiones de costos y tiempo. Por esta razón en este trabajo se está tratando de establecer si existe una variabilidad cultural y/o morfológica que se pudieran utilizar como parámetro(s) y que facilite la identificación de *Fusarium* spp. a nivel regional. Por último se quiere establecer las condiciones óptimas (pH, temperatura, fotoperiodo) de desarrollo de *Fusarium* spp. a nivel de laboratorio para estudios futuros genéticos, de patogenicidad, control, etc. En resumen en esta investigación buscamos esbozar un enfoque práctico para identificar especies patógenas a plantas de *Fusarium*, a nivel regional. Sin embargo los principios esbozados pueden ser usados en caso de desear identificar *Fusarium* de cultivos que se originan de otras fuentes y también pueden encontrarse aplicaciones de este estudio para otros hongos.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. General**

Identificar y caracterizar el/los agentes causales de la pudrición de la corona del espárrago en la Región de Caborca, Sonora.

### **4.2. Específicos**

- a) Identificar molecularmente el/los agentes causales de la pudrición de la corona del espárrago.
  
- b) Determinar si existe variabilidad cultural, morfológica y fisiológica entre los aislamientos identificados de *Fusarium* spp. en la Región de Caborca, Sonora.

## **5. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **5.1. Colección de la fuente del inóculo**

Se colectaron 5 coronas por planta de espárrago de cinco campos de la región de Caborca, Sonora, los cuales tenían antecedentes de la presencia de la enfermedad FCRR. Se eligieron 5 helechos adultos que presentaban la sintomatología típica de la enfermedad por cada campo, se colectaron un total de 25 coronas. Las coronas se colocaron en bolsas limpias de plástico, rotuladas con la fecha y lugar de procedencia. A su vez las bolsas cerradas se colocaron en una hielera para ser transportadas al laboratorio de Fitopatología y Nematología de la Universidad de Sonora Unidad Regional Norte Caborca.

Los campos muestreados fueron Angostura (N30° 50.920 W112°48.870'), Candelaria (N30° 30.412 W112°48.870'), El Coyote (N30° 50.755 W112°36.500'), Los Pinos (N30° 39.203 W111°57.48') y el Campo Viva (N30° 45.331 W112°20.287'). Las edades de las esparragueras, localización y la variedad sembrada se muestran en Tabla 2 y Figura 3.



Figura 4. Mapa de la Región de Caborca, Sonora mostrando los campos Angostura, Candelaria, Los Pinos, Coyote y Viva.

Tabla 2. Descripción de cinco campos muestreados

<b>Campo</b>	<b>Variiedad Sembrada</b>	<b>Vida del Cultivo (años)</b>
Angostura	Brock	8
Candelaria	Brock	10
El Coyote	Brock	8
Los Pinos	Brock	12
Viva	Brock	10

## 5.2. Aislamiento del inóculo a partir de tejido enfermo y obtención de cultivos puros

Una vez en el laboratorio, las coronas se enjuagaron con agua corriente hasta remover toda la tierra, se colocaron en una cubeta con cloro (Clorox comercial) al 5% durante 5 minutos, pasado este tiempo se transfirieron a una cubeta con agua destilada estéril por un tiempo de 15 minutos y se repitió este procedimiento 3 veces o hasta que se dejó de percibir el olor a cloro. Una vez

lavadas y desinfectadas las coronas se cortaron con un bisturí (previamente flameado) en porciones aproximadas de 3x2 cm<sup>2</sup> para facilitar el manejo de las mismas. Estas porciones de tejido a su vez fueron cortadas longitudinalmente y se identificaron las áreas que mostraban tanto tejido sano como tejido necrosado. De estas áreas identificadas se volvieron a obtener secciones más pequeñas de aproximadamente de 1x0.5 cm<sup>2</sup>. Estas secciones más pequeñas se colocaron en un vaso de precipitado con cloro al 1% durante 1 minuto, posteriormente se enjuagaron con agua destilada estéril 3 veces por 3 minutos. Las porciones desinfectadas se colocaron en papel filtro estéril No. 4 Whatman para absorber el exceso de agua. Todo este procedimiento se llevó a cabo dentro de una cámara de transferencia (marca Labconco).

Las porciones de raíces enfermas disectadas y esterilizadas se sembraron en cajas Petri (90 mm marca Interlux) con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) (BD Difco). Se sembraron 10 cajas Petri a partir de tejido enfermo por cada campo. Las cajas petri se sellaron con parafilm (Laboratory Film, Bemis) y se colocaron a 28°C en una incubadora (Fisher Scientific modelo 146E). Para la obtención de cultivos puros, se realizaron resiembras en agar V8 (Apéndice D) de los aislamientos en PDA (Apéndice F). A partir de este punto el medio agar V8 fue usado para la sucesiva reproducción de nuestros aislamientos (Summerell *et al.*, 2003).

### **5.3. Preparación de cultivos monospóricos y de puntas de hifas**

Para asegurarse de que cada aislamiento se trata de una sola raza/cepa (y asegurar el origen uninucleado del cultivo), se procedió a realizar cultivos monospóricos y de punta de hifa de cada uno de nuestros aislamientos. Se prepararon 5 cajas por aislamiento de agua agar al 2% (Apéndice A). Se tomó una muestra del cultivo puro con una asa bacteriológica previamente flameada al rojo vivo y enfriada (se pasa suavemente el asa por la masa de esporas del cultivo puro), con el asa se dibujó sobre el agar una línea vertical y se comenzó a estriar en zigzag muy cerrado hacia abajo y se fue incrementando la distancia entre las líneas del zigzag, de manera que estas quedaron separadas cada vez más una de la otra hacia el final (figura 4). De

esta manera también se logra que las conidias queden muy separadas entre sí.

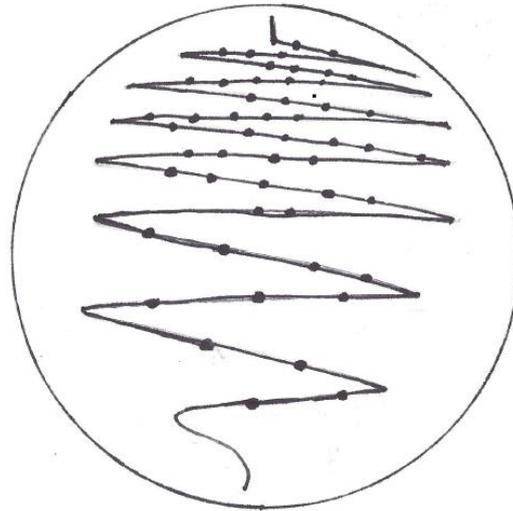


Figura 5. Estriado para cultivo monospórico.

Las cajas Petri se sellaron y se dejaron a temperatura ambiente en cajas plásticas con tapa (marca Sterilite de 34.3 cm x 20.3 cm x 12.7 cm). A partir de las 12 horas usando un microscopio de disección (marca Iroscope modelo IRO-NZ-14) se comenzaron a hacer observaciones. Las observaciones consistieron en localizar conidias aisladas en proceso de germinación. Una vez detectadas estas conidias emitiendo su tubo germinativo y asegurándose de que no existiera en el área cercana, presencia de otras conidias o hifas originadas de otras conidias se procedió a cortar con un bisturí y bajo el microscopio de disección un cuadro de agar con la punta de la hifa o bien cortar un cuadro de agar con la conidia y tubo germinativo (Choi *et al.*, 1999). Esta sección de agar fue transferida a una caja petri con medio V8 (Apéndice D). Las cajas se incubaron a 28°C en una incubadora (modelo, marca) y se dejaron desarrollar las colonias. Una vez obtenidos los cultivos monospóricos se procedió a almacenar y preservar los aislamientos mediante la técnica de sílica gel (Windels *et al.*, 1987).

#### **5.4. Preparación de tubos de sílica gel**

Como la identificación de las especies de *Fusarium* está basada en sus características culturales y en la gran variación de la morfología de sus esporas es de suma importancia mantener los cultivos para una identificación comparativa. También fue de nuestro interés mantener las cepas patogénicas para las pruebas de patogenicidad e identificaciones moleculares. La técnica usada fue tomada de (Windels et al, 1987), en la cual se usan tubos de ensaye llenos a  $\frac{3}{4}$  de su capacidad con cristales de sílica gel ( $\text{SiO}_2$ , S-12 mesh, Grade 40) (previamente esterilizados en una estufa), sobre los cuales se vierte una suspensión de esporas en leche desgrasada al 5%. Este método nos resultó muy eficiente ya que logramos tener un 100% de viabilidad por un periodo de hasta 1 año.

#### **5.5. Identificación molecular de los aislamientos**

Se identificó molecularmente las especies de *Fusarium* presentes mediante el análisis de EF-1 $\alpha$ . Para esto fue necesario preparar el homogenado del hongo y proceder a la extracción de ADN.

##### **5.5.1. Preparación del homogenado y Aislamiento de ADN**

Los aislamientos de *Fusarium* spp. fueron reproducidos en un medio líquido de Glucosa-Asparragina (Apéndice C). El medio GA es un medio no selectivo. Con un asa previamente flameada se tomó una cantidad abundante de spora de la caja Petri. Esta asa se introdujo en un matraz de 250 mL con el medio líquido GA. El matraz con medio de cultivo se colocó en un agitador-incubadora (New Brunswick Scientific CO., Inc. Series 25 Incubator shaker) por 48 h a temperatura de 25°C y a una velocidad de agitación 150-200 rpm la cual es una velocidad estándar.

## **Extracción de Micelio**

Una vez pasadas las 48 h, se conectó un matraz de filtración a una manguera de vacío. A dicho matraz se le adaptó un embudo Buchner (de 12.5 cm de diámetro). Al embudo se le colocó en el interior un papel filtro No. 4 (marca Whatman de 70 mm de diámetro). El papel filtro se colocó con la cara áspera hacia arriba. Se abrió la llave de vacío y en seguida se vació el medio líquido lentamente. Se agregó agua destilada estéril varias veces para enjuagar el micelio. Una vez filtrado el micelio y esporas se separaron del papel filtro con una espátula (estéril) y se colocaron en cajas Petri previamente etiquetadas con la fecha y nombres de los aislamientos.

## **Liofilizado**

Las cajas Petri fueron colocadas en un liofilizador (Gyrorotary shaker freezer) a -20°C por un periodo de 12 h donde fue congelado y deshidratado para posteriormente ser procesado.

## **Fraccionamiento celular mecánico**

Una vez liofilizado el material se pasó a realizar un fraccionamiento celular mecánico. Para esto se utilizó un mortero previamente esterilizado. En él se colocó el material fúngico liofilizado y se trituró suavemente. Después se agregó nitrógeno líquido y se molió más finamente, esto se repitió 2 veces. El material pulverizado fue colocado en un tubo Falcón de 10 mL. Este proceso se repitió para cada uno de los aislamientos.

## **Aislamiento de ADN a partir del homogenado de *Fusarium* sp.**

Para el lisado de las células se usó 75-125 mg del micelio pulverizado o lo suficiente para completar 1 mL del tubo Falcon, se agregó 5mL del buffer de aislamiento (Apéndice L). Se pasó por el vortex (marca Talboys modelo 945603) hasta que se suspendió. Se adicionó 0.3 mg/mL proteasa K, se mezcló y se incubó a 55°C por 15 min (la proteinasa K es opcional pero p

mejorar la cantidad de ADN obtenida. Mayor tiempo a 55°C decrece la cosecha de ADN). Se adicionó 2.5 mL de NH<sub>4</sub> y se invirtió el tubo para mezclar y se incubó en hielo por 20 min. Se centrifugó por 10 min en un rotor HB-4 a ca. 5000-8000 rpm a 4°C. Se decantó el supernadante en un tubo Falcón nuevo (este paso puede ser un paso de espera).

Se precipitó el ADN adicionando de 4.5 a 5.0 mL de isopropanol. Se invirtió el tubo para mezclar. Se incubó por 60 min. Se centrifugó por 10 minutos en un rotor HB-4 a ca. 5000-8000 rpm a 4°C. Se decantó el supernadante y se enjuagó con etanol al 80%. Se centrifugó a máxima velocidad por 5-10 minutos y se vació el etanol. Se **seco** al aire el pellet. Después del secado, se resuspendió el pellet en 800 µl de H<sub>2</sub>O y se almacenó a 4°C por 12 hr. Una vez resuspendido el ADN se transfirió a un tubo Ependorff y se adicionó 25-50 µg de RNAasa . Se incubó a 37°C por 30 min.

Se utilizó soluciones de Fenol (1 vez), Fenol:Cloroformo 1:1 (1 vez), y Cloroformo/Alcohol isoamílico 24:1(2 veces) (Apéndice N y M) para extraer el ADN. Se agregaron 500µL de la solución extractora, se mezcló invirtiendo el tubo, se incubó en hielo por 5-10 min y se centrifugó a alta velocidad por 5-10 min a 4°C (se puede almacenar el ADN a 4°C). Para la precipitación con PEG, se adicionó 500µL de una solución de PEG/NaCl (20% Polietilenglicol 8000, 2.5 M NaCl). Se invirtió el tubo para mezclar, se incubó en hielo por 60 min, se centrifugó de 10-15 min, se lavó el pellet de ADN de 2 a 3 veces con etanol al 80%. Se secó al aire el pellet para evaporar el etanol y se disolvió en 400 µL de TE buffer (Apéndice P). Se limpió la muestra y cuantificó el ADN utilizando un Nanodrop (ND-1000 Spectrophotometer Thermo Scientific). El ADN se almacenó a -20°C.

### **5.5.2. Secuenciación de ADN**

Una vez aislado, amplificado y cuantificado el ADN, se envió a secuenciar al laboratorio del Dr. Kerry O'Donnell del Departamento de Agricultura de EE.UU. (NCAUR-ARS-USDA) en Peoria, Illinois.

## 5.6. Pruebas de patogenicidad

Se realizaron pruebas de patogenicidad *in vivo* siguiendo los Postulados de Koch para determinar si los aislamientos eran patogénicos al cultivo de espárrago (Agrios, 1997). Para realizar estas pruebas se esterilizó semilla de espárrago de las variedades: UC72, UC-157 F2, Mary Washington y Brock usando alcohol al 96% y cloro 10% (v/v). Una vez desinfectadas las semillas, se procedió a ponerlas a germinar en charolas con agar al 1% y papel de germinación previamente esterilizado (Figura 5). Las charolas se colocaron en incubadoras a 26 °C en la oscuridad por un periodo de 4-6 días, hasta que germinaron.



Figura 6. Charolas para germinación de semillas de espárrago con papel de germinación y agua agar al 1 %.

## 5.7. Preparación de la suspensión stock de esporas

Para obtener nuestra solución stock de esporas, se agregaron 5 ml de agua destilada estéril a la caja petri con la colonia desarrollada del aislamiento a trabajar. Una vez agregada el agua, se procedió a realizar un frotado con una espátula Drigalsky, sobre la superficie del agar de manera muy suave para liberar las esporas a la suspensión. Después de hacer esto se inclinó la caja Petri y se pipeteó de vuelta 4 mL del agua ya en suspensión con las esporas con una micropipeta de 1000 mL (marca LABMATE Soft). La

suspensión de esporas se colocó en tubos Falcón (marca BD de 15 mL) y se refrigeraron (marca Whirlpool modelo LWT1031D) a 4°C. La concentración de la suspensión de esporas en el tubo se realizó utilizando cámara de Neubauer (marca Optik Labor).

### 5.8. Cuantificación de la concentración de esporas en la suspensión stock

La suspensión de esporas se agitó usando un vortex (marca Talboys modelo 945603) por 5 segundos. Se agregaron 10 µL de la suspensión de esporas sobre la cámara de Neubauer en el área A, B, C, D y E como se muestra en la figura No. X. Utilizando un microscopio Olympus CX 31 y enfocando con el objetivo 40X, se contaron las esporas en las áreas mencionadas y se calculó el promedio (sumando el total de esporas de las 5 áreas y dividiendo entre 5). Se contaron las esporas en las zonas A, B, C, D y E (Figura 6).

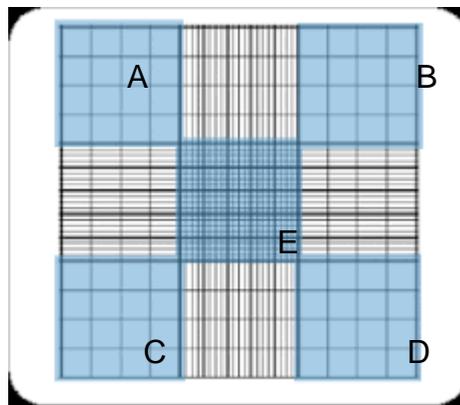


Figura 7. Cuadrícula de Cámara de Neubauer.

El número de esporas por mL se determinó con la siguiente fórmula:

$$(A + B + C + D + E) \times 50,000$$

Dónde:  $A + B + C + D + E$  son las áreas de la cuadrícula de la cámara de Neubauer donde se cuentan las esporas y 50,000 es la constante de concentración. Una vez cuantificada la concentración de esporas de la

suspensión stock se pasó a hacer las diluciones necesarias para obtener la concentración deseada ( $1 \times 10^5$  esporas/mL) para de cada uno de los aislamientos utilizando la fórmula  $C_1V_1 = C_2V_2$

### **5.9. Diluciones para la preparación de la concentración de esporas deseada**

Para obtener 20 mL de una suspensión de esporas a una concentración de  $1 \times 10^5$  esporas/ml se utilizó la fórmula:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Dónde  $C_1$  es la concentración de la suspensión stock,  $C_2$  es la concentración que se quiere obtener ( $1 \times 10^5$  esporas/ml),  $V_1$  es el volumen de la suspensión stock que se va agregar al volumen de agua para obtener la concentración deseada y  $V_2$  es el volumen que se quiere preparar de la dilución

### **5.10. Inoculación de las plántulas de espárrago**

Una vez desinfectadas las semillas de espárrago y germinadas en sus correspondientes charolas, se procedió a traspasar de las charolas a bolsas de germinación (de 16.5 cm x 17.5 cm Mega International, Saint Paul MN). Las bolsas de germinación fueron preparadas previamente con 15 mL de agua destilada estéril y se colocaron entre 5 y 6 semillas cuando mostraban una radícula mayor de 3mm de longitud. Las bolsas se mantuvieron a temperatura ambiente bajo condiciones de 12 h luz y 12 h oscuridad. Una vez que las raíces alcanzaron al menos 1.5 cm de longitud se inoculó con *Fusarium* spp. a lo largo de la raíz de la plántula en 100  $\mu$ L de la suspensión de esporas a una concentración de  $1 \times 10^5$  esporas/mL. El testigo consistió en 10 plantas por variedad de espárrago y se inoculó con 100  $\mu$ L de agua destilada estéril por planta. Se infectaron 10 plantas por cada variedad de espárrago (4) con cada uno de los 5 aislamientos de *Fusarium* spp. (240 plantas en total) (Figura 7).

Después de inoculadas las plántulas, las bolsas se mantuvieron en posición horizontal por un periodo de 2 h para evitar el escurrimiento de la suspensión de esporas. Pasado este tiempo las bolsas se mantuvieron en

posición horizontal a 27°C en una incubadora por 12 h y pasado este periodo a temperatura ambiente y bajo condiciones de 12 h luz y 12 h de oscuridad. Diariamente se agregaron entre 1-5 mL de agua destilada a cada bolsa para mantener la humedad de la bolsa. Las plántulas se mantuvieron desde este momento bajo observación para detectar la aparición de síntomas característicos de la enfermedad (necrosamiento y/o estrangulamiento de la raíz). La aparición de manchas necróticas en la raíz se consideró como patogenicidad positiva.

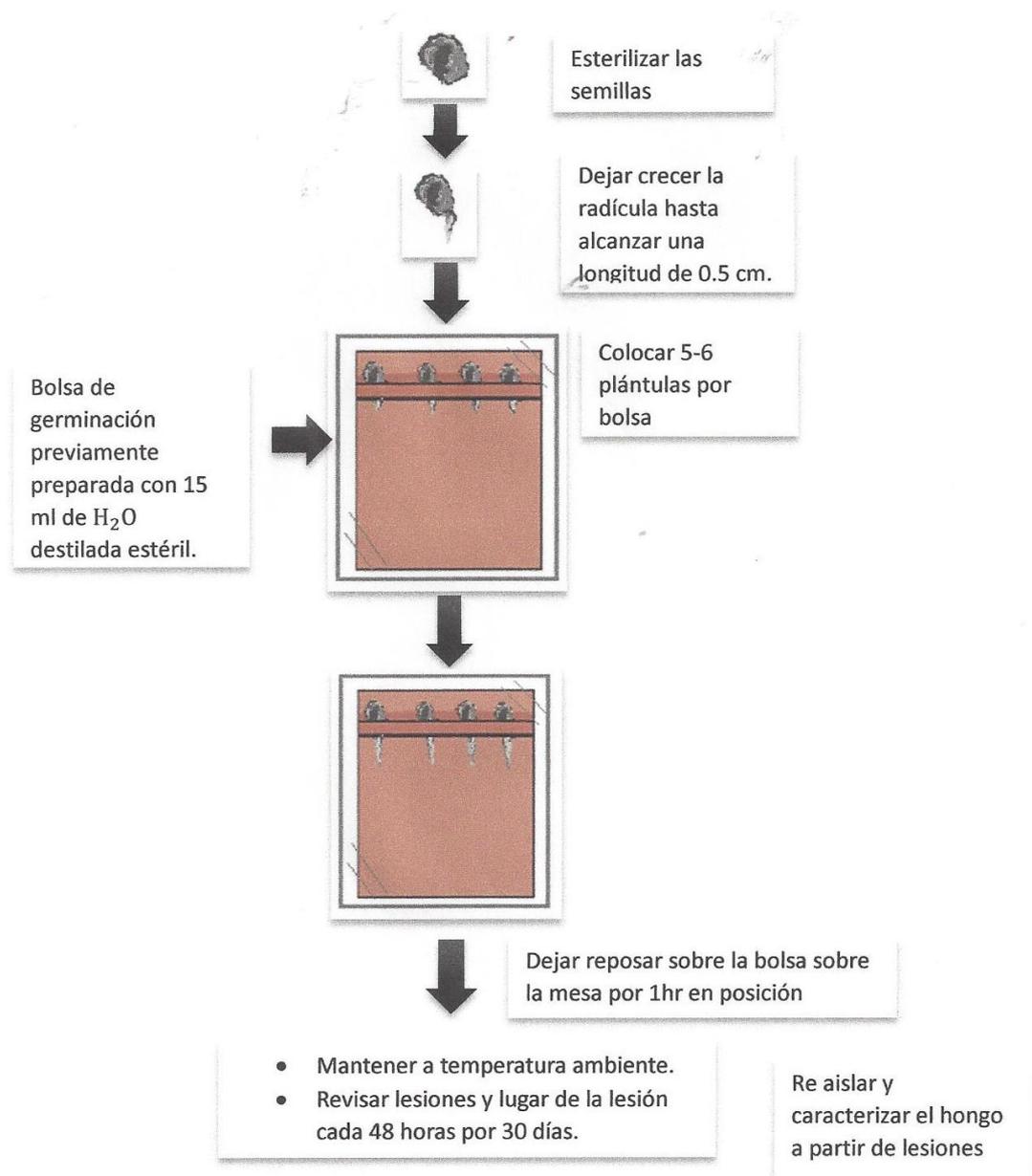


Figura 8. Diagrama de flujo de inoculación de plántulas de espárrago con 100  $\mu$ L de una suspensión de esporas de *Fusarium* spp. a una concentración de  $1 \times 10^5$  esporas/mL. Dibujo: Cid G. Ámbar.

### **5.11. Reaislamiento del patógeno**

Se seccionaron con una navaja de doble filo (marca Gillette) previamente esterilizada, muestras de tejido necrosado de las plántulas infectadas artificialmente y se desinfectaron en una solución de cloro al 0.1% por 1 minuto, pasado este periodo se lavaron 3 veces en agua destilada estéril. La muestra de tejido enfermo fue secada en papel filtro No. 4 (marca Whatman) estéril y se sembró en PDA. Una vez que la colonia se desarrolló se comparó la morfología y características culturales con el inóculo inicial de campo para así completar los Postulados de Koch y corroborar que se trataba del mismo patógeno.

### **5.12. Determinación de las características de cultivo**

La pigmentación de la colonia es un carácter secundario utilizado para la identificación de especies al igual que la apariencia general del cultivo.

#### **5.12.1. Producción de pigmentos y apariencia de la colonia**

Los aislamientos se sembraron a partir de gránulos de sílica gel embebidos con *Fusarium*. Se sembraron 4 cajas por aislamiento haciendo un total de 20 cajas Petri. Las cajas se colocaron a temperatura ambiente bajo 12 h de luz y 12 h de oscuridad durante 7 días. Las cajas no fueron selladas en base a las observaciones de Seifert (2000), citado por López *et al.*, (2004) que plantea la influencia negativa que tiene el sellar las cajas petri con parafilm en algunos caracteres culturales de las especies de *Fusarium*. Pasados los 7 días se categorizó el color de la colonia utilizando la escala de colores de Domínguez (1947). Además de las pigmentaciones en el medio, se realizaron observaciones con respecto a la apariencia de la colonia de acuerdo a si era compacta, con crecimiento aéreo, plana, esponjosa, algodonosa, micelio abundante, delgada (Leslie *et al.*, 2006).

### **5.13. Determinación de las características morfológicas de los aislamientos**

Las características morfológicas son la principal base para la identificación y taxonomía de *Fusarium* spp. Las especies de *Fusarium* pueden producir tres tipos de esporas llamadas microconidias, macroconidias y clamidosporas (Figuras 1, 2, 8 y 9).

#### **5.13.1. Forma y tamaño de las microconidias y macroconidias**

Se realizaron siembras en PDA para la observación de microconidias y siembras en PDA para la observación de las microconidias. Todas las siembras a partir de inóculo embebido con *Fusarium* sp. en cristales de sílica gel. Para la observación de microconidias se colocó sobre un portaobjetos (marca Velab de 26 mm x 76 mm) 10 $\mu$ L de una suspensión de esporas en PDB y se caracterizaron respecto a su forma usando The Fusarium Laboratory Manual (Leslie *et al.*, 2006). Se tomaron también las medidas de ancho y largo de 150 microconidias para cada uno de los cinco aislamientos con un objetivo de 100x utilizando un microscopio Olympus CX31 y el Software Image-Pro Plus. Los resultados se analizaron estadísticamente usando ANOVA.

Para el caso de la caracterización de las macroconidias se prepararon 6 medios diferentes en búsqueda de una producción abundante de estas. Se usaron los medios de PDA, PD, agar V8, CLA, SNA (Apéndice G) y Agua sucrosa 1% (Leslie *et al.*, 2006; Herrera *et al.*, 2012). Se tomaron muestras haciendo raspados en caso de los medios sólidos y de suspensión de esporas si el medio era líquido, para hacer observaciones con respecto al ancho, largo, número de septos, forma del pie y ápice de la macroconidia usando como base The Fusarium Laboratory Manual de (Leslie *et al.*, 2006) (Figura 9). La muestra se colocó sobre un portaobjetos con una gota de solución de agua y azul de metileno y se observó a 100x con un microscopio Olympus CX31 y el Software Image-Pro Plus fue usado para tomar medidas. En vista de que la producción de macroconidias fue muy escasa en todos los aislamientos solo

se tomaron las medidas de 10 macroconidias por aislamiento. Los resultados se analizaron estadísticamente usando ANOVA.

## MICROCONIDIAS

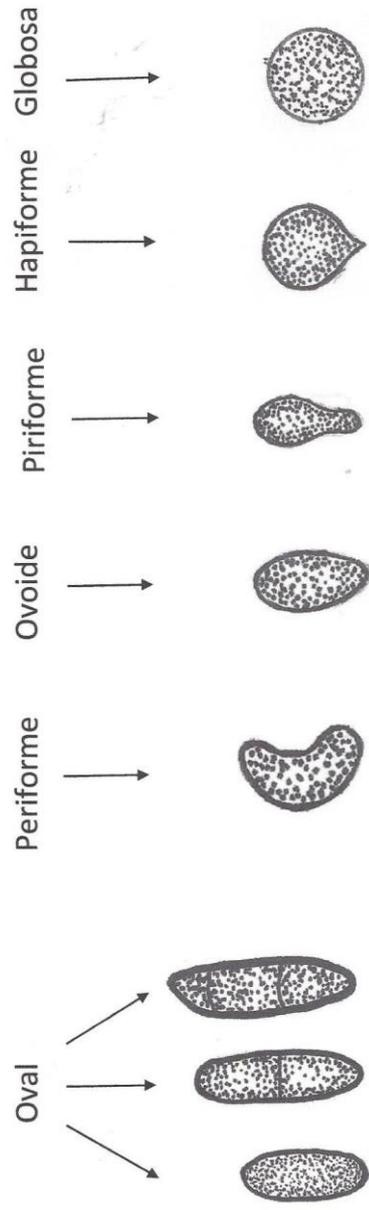


Figura 9. Formas de microconidias de *Fusarium* spp. (Modificado de Leslie, et al., 2006) Dibujo: Reyna R. L.

# MACROCONIDIAS

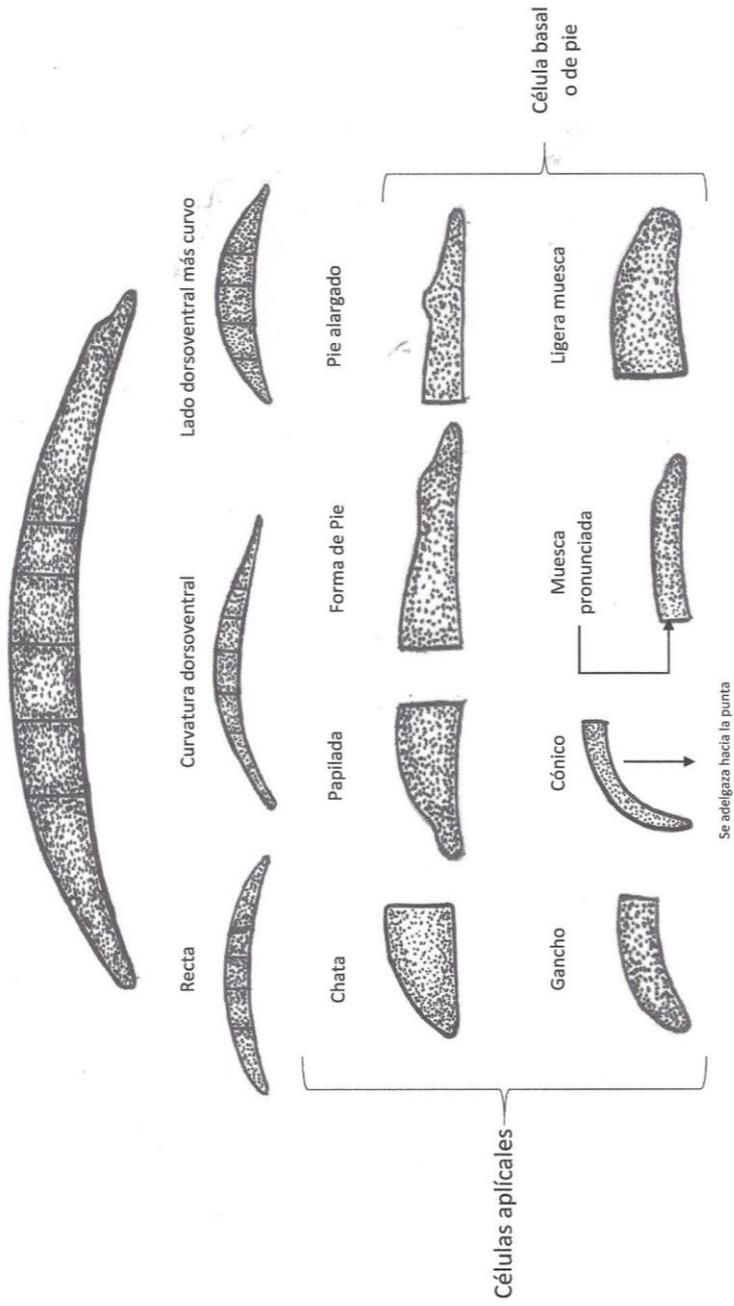


Figura 10. Macroconidias de *Fusarium* spp. Mostrando formas de las células apicales y basales (Modificado de Leslie, et al., 2006) Dibujo: Reyna R. L.

### 5.13.2. Producción de clamidosporas

La presencia o ausencia de clamidosporas es un carácter primario para la taxonomía de *Fusarium*, si las clamidosporas están presentes se pueden encontrar aisladas, en pares, agrupadas o en cadenas, y pueden ser lisas o rugosas. Para la caracterización y determinación de la presencia o ausencia de clamidosporas en los cinco aislamientos, se sembraron 5 cajas por aislamiento a partir de inóculo embebido en cristales de sílica gel en CLA, agar suelo (Apéndice H) y SNA (Leslie *et al.*, 2006). Una vez sembrada las cajas, se sellaron con parafilm y se dejaron a temperatura ambiente y se observaron por un periodo de 2 a 6 semanas. Para la observación de clamidosporas se tomó una muestra ya sea mediante un raspado de la colonia o se tomó 10 µL del medio (dependiendo si se trata de un medio líquido o un medio sólido). La muestra se colocó sobre un portaobjeto con una gota de agua con azul de metileno, se colocó un cubreobjetos y se observó a 100X en un microscopio Olympus CX31 buscando el desarrollo de clamidosporas. Se tomaron fotografías de las clamidosporas con Software Image-Pro Plus (Goyal, *et al* 1973; Nicoli *et al* 2013; Hsu *et al.*, 1972) (Figura 1).

### 5.13.3. Tipos de fiálides

Una fiálide es una proyección en forma de frasco de una vesícula (la parte dilatada de la punta del conidióforo) que es característica de ciertos hongos como *Fusarium*. Sirven de células basales sobre las cuales crecen las conidias (es decir es una célula conidiógena). La presencia/ausencia de monofialides o polifialides son características de identificación de *Fusarium* spp. Se sembraron los cinco aislamientos en PDB, se incubaron a 26°C y durante 15 días cada tercer día se tomaron 10µL del medio, los cuales se colocaron sobre un portaobjetos para determinar la presencia y tipo de fiálides con el auxilio de un microscopio Olympus CX31 con un objetivo 100x . Se tomaron fotografías con el Software Image-Pro Plus (Leslie *et al.*, 2006)(Figura 2).

## **5.14. Determinación de características fisiológicas de los aislamientos**

Se evaluó el efecto sobre el crecimiento de nuestros cinco aislamientos de *Fusarium* spp. a siete temperaturas, a tres fotoperiodos y a seis pH diferentes.

### **5.14.1. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento radial de los aislamientos de *Fusarium* spp.**

Se evaluó el efecto sobre el crecimiento de *Fusarium* spp. a siete diferentes temperaturas (3°, 9°, 15°, 21°, 27°, 33° y 39°C) por un periodo de 7 días. Este experimento se repitió 3 veces. Para cada repetición se sembraron 4 cajas de cada aislamiento en agar V8 y cada temperatura (haciendo un total de 140 cajas por repetición), las cajas se sellaron con parafilm para evitar contaminación y se colocaron en las incubadoras (marca Fisher Scientific modelo 146E) a las temperaturas anteriormente mencionadas. Se registró diariamente diámetro de la colonia durante 7 días (crecimiento radial) (Dietert *et al* 1983). Los datos se analizaron estadísticamente usando las pruebas de ANOVA.

### **5.14.2. Efecto del pH sobre el crecimiento radial de los aislamientos de *Fusarium* spp.**

Se determinó el efecto del pH sobre el crecimiento radial de los aislamientos de *Fusarium* spp., para esto se sembraron 180 cajas Petri con cada aislamiento usando agar V8 con diferentes pH. Se evaluaron seis pH (5, 6, 7, 8, 9, 10). Este experimento se repitió al igual que el anterior 3 veces. Para cada repetición, se prepararon 500 mL de agar V8 y el pH del medio se ajustó utilizando soluciones de HCl 0.1 N y de NaOH 0.1 N. Para que el medio no solidificará durante el proceso de ajuste de pH, este se mantuvo sobre una placa de calentamiento con agitación, mientras los demás matraces se mantuvieron en baño María marca VWR Scientific modelo 1225) a la espera de su ajuste. Un potenciómetro (marca Thermo Scientific modelo Orion 3 Star) para la medición de pH fue utilizado. Igualmente se utilizaron buffers 4.0 (para el pH 5), 7.0 (para los pH 6, 7 y 8) y 10.0 (para los pH 9 y 10). Después de

ajustar los pH de los medios se esterilizaron en una autoclave a 121°C (marca UL modelo 25X) durante 15 minutos. Una vez sembradas las cajas petri con los aislamientos, estos sellaron con parafilm para evitar contaminación y se colocaron en una incubadora a 27°C en la oscuridad. Se hicieron mediciones diarias del crecimiento radial de la colonia por un total de 7 días (Dietert et al 1983; López y López 2004). Los resultados se analizaron estadísticamente por ANOVA.

#### **5.14.3. Efecto del fotoperiodo sobre el crecimiento radial de los aislamientos de *Fusarium* spp.**

Se evaluó el efecto de 3 diferentes condiciones lumínicas sobre el crecimiento radial de los 5 aislamientos de *Fusarium* spp.: luz blanca, luz ultravioleta y oscuridad. Se sembraron 3 cajas por cada aislamiento y por cada tratamiento (haciendo un total de 60 cajas por repetición). El experimento se repitió 3 veces. Las siembras se hicieron a partir de inóculo embebido en sílica gel y medio agar V8. Las cajas se colocaron en una incubadora con luz blanca por 24 h diarias por 7 días. Veinte cajas Petri se colocaron en una incubadora sin luz envueltas en papel estraza y otras veinte cajas Petri se colocaron en una incubadora con luz ultravioleta 24 h diarias. Todas las cajas se mantuvieron a 25 °C. Se tomaron datos de crecimiento radial diariamente por 7 días (Dieteret et al 1983.). Los resultados fueron analizados estadísticamente usando ANOVA.

#### **5.15. Caracterización Físico–Química del suelo de las áreas muestreadas**

Se caracterizó el suelo de los campos muestreados con respecto a sus características físico químicas. Estos análisis se realizaron en el laboratorio de Suelos de la Universidad de Sonora, Unidad regional Norte. Se determinó la fertilidad, salinidad, conductividad eléctrica y materia orgánica utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica modelo GBC 932 plus, espectrofotómetro ultravioleta visible (modelo Hash DR5000). Análisis de fertilidad (N, P, K, Mg, Ca y Na) usando la técnica de solución extractora de acetato de amonio para Ca, Mg, Na y K la del ácido fenoldisulfónico para

determinar nitrato, Bray-P1 para determinar fósforo. Salinidad (pH en pasta saturada con un potenciómetro (marca Thermo Scientific modelo Orion 3 Star) y conductividad eléctrica en el extracto de saturación con un conductivímetro (marca Corning Pinnacle modelo 300222) y de textura técnica hidrómetro de Buyucus. La materia orgánica se determinó por el Método Walkley-Black (McKeague ,1981; Vázquez, 2014).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Caracterización Molecular de los aislamientos

Diferentes especies de *Fusarium* se han identificado en diversas regiones del mundo. En el caso de la Región de Caborca, la especie de predominante en esta investigación fue *Fusarium proliferatum*. Esta especie se identificó para los aislamientos Angostura, Candelaria y Los Pinos. En Estados Unidos es la especie comúnmente reportada como causante de FCRR (Morrison III *et al.*, 2011; Hammel *et al.*, 2005).

El aislamiento Coyote fue identificado como *Fusarium oxysporum* cercano a el aislamiento NRRL 26422 el cual es reportado como *Fusarium oxysporum* f.sp. *meniscoideum*. Se tienen antecedentes de la presencia de *F. oxysporum* en esparragueras pero fue inesperado identificar una cepa cercana a la formae special *meniscoideum* y no la formae special *asparagi*. Será necesario en el futuro realizar pruebas de patogenicidad usando hospederas diferenciales específicas para determinar el rango de hospederas de esta formae special. *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* ha sido directamente asociado a la declinación prematura y a la inhabilidad de establecer nuevas plantaciones donde se ha sembrado espárrago anteriormente (Weber *et al.*, 2007). Al igual que *F. proliferatum* ha sido reportada como el agente causal primario de FCRR en EE.UU. (Morrison III *et al.*, 2011; Hammel *et al.*, 2005) por lo que nuestros resultados coinciden con estos autores. En Guanajuato, México, tres especies de *Fusarium* han sido asociadas con FCRR, estas son *F. oxysporum* (59% de la frecuencia de los aislamientos), *F. moniliforme* (30%) y *F. solani* (11%) (Quilambaqui-Jara, *et al.*, 2004). Por último el aislamiento Viva *Fusarium* nsp. concuerda molecularmente con un aislamiento obtenido de *Phoenix canariensis* de California (almacenado en la colección del Departamento de Agricultura de

EE. UU.). Parece ser una especie novel para el espárrago dentro del complejo de *Fusarium fujikuroi* (de la misma clade de *F. verticilloides*). Estudios moleculares adicionales serán necesarios para completar la identificación molecular de esta especie. También será necesario realizar pruebas de patogenicidad con hospederas diferenciales. *Phoenix canariensis* es una palma datilera y se tienen conocimiento de que en el área de origen de este aislamiento (Campo Viva) se encuentran palmas datileras establecidas desde hace 5 años, lo que abre la posibilidad que estas hayan sido la fuente del inóculo inicial del patógeno.

Los resultados presentados en esta investigación provienen solo de 25 muestras, lo que válida nuestros resultados únicamente para el área muestreada pero el número de muestras no es representativo de la Región de Caborca. Este trabajo establece la base para que a corto plazo pudiéramos realizar un muestreo mucho más amplio y representativo de toda la región esparraguera de Caborca.

Asimismo los hongos aislados en este trabajo fueron únicamente a partir de coronas de plantas sintomáticas que mostraban necrosamiento en la corona. Consideramos que sería también interesante muestrear en una forma más al azar y también muestrear diferentes partes de la planta para tener una mejor idea de la epidemiología del hongo en la planta, ya que existen reportes de la existencia de *F. proliferatum* y *F. oxysporum* aislados además de en coronas también a partir de tallos y raíces de plantas de espárrago (Schreuder *et al.*, 1995).

Tabla 3. Resultados de análisis moleculares de los aislamientos mediante el análisis de EF-1 $\alpha$ .

Aislamiento	Especie identificada
Angostura	<i>Fusarium proliferatum</i>
Candelaria	<i>Fusarium proliferatum</i>
Los Pinos	<i>Fusarium proliferatum</i>
Coyote	Miembro del complejo de las especies de <i>Fusarium oxysporum</i> cercano a NRRL 26422 ( <i>Fusarium oxysporum f.sp. meniscoideum</i> )
Viva	<i>Fusarium</i> nsp. Concuerda con aislamiento de <i>Phoenix canariensis</i> de California que parece ser una especie novel dentro del complejo de <i>Fusarium fujikuroi</i> (de la misma clade de <i>F. verticilloides</i> )

## 6.2 Pruebas de patogenicidad

Todos los aislamientos resultaron patogénicos al espárrago al aplicarse los Postulados de Koch. Se consideró patogenicidad positiva ante la aparición de manchas necróticas en las raíces como se muestra en la Foto No. X. Se comenzó a observar necrosamiento de las raíces a partir de los 10 días después de la inoculación. Se observó también marchitamiento y crecimiento raquíptico de las plántulas de espárrago (Tabla 4).

Tabla 4. Pruebas de patogenicidad para cinco aislamientos de *Fusarium* spp.

Aislamiento	Patogenicidad
Angostura	+
Candelaria	+
Los Pinos	+
El Coyote	+
Viva	+



Figura 11. Plántulas de espárrago mostrando necrosamiento en las raíces después de 10 días de infección con el aislamiento A. Viva (*Fusarium* nsp.) B. Los Pinos (*F. proliferatum*).

### 6.3 Caracterización cultural de los aislamientos

#### 6.3.1 Aspecto de la colonia

El aspecto de la colonia varió de acuerdo al medio, la forma de sembrar y las condiciones ambientales en que crecieron los aislamientos. Angostura presentó un crecimiento algodonoso, plano e irregular. En el caso de

Candelaria el crecimiento fue abundante, esponjoso e irregular, Los Pinos y el Coyote mostraron micelio más plano, es decir más pegado al agar y con un crecimiento más regular es decir cubriendo la caja Petri en forma más uniforme (Tabla 5). En PDA en siembras por estriado se observó que Viva presentó una forma de colonia más esponjosa, algodonosa, micelio abundante y creció en manchones. En la foto X se muestra el aspecto de los aislamientos sembrados en Agar V8 a partir de gránulos de sílica gel embebidos de esporas. De acuerdo a Djeugap *et al.*, 2017, el color y características físicas del micelio de *Fusarium oxysporum* puede variar de acuerdo al medio de cultivo usado, lo que coincide con la experiencia en esta investigación con nuestros 5 aislamientos.

Tabla 5. Características de cultivo de cinco aislamientos de *Fusarium* spp en medio Agar V8 según (Villalobos, Villalobos, 1947).

Aislamiento	Especie Identificada	Colonia Micelio	Color del Micelio	Color del Sustrato*
Angostura	<i>F. proliferatum</i>	Plana, ligera e irregular	Blanco con pigmentos oscuros cafés	Anaranjado amarillento-manchado irregular purpura (OOY) 10°-15*
Candelaria	<i>F. proliferatum</i>	Esponjoso, irregular	Blanco amarillento, con pigmentaciones oscuras, escasas e irregulares	Amarillo Cremoso (OOr) 10°-17 manchado irregular purpura
Los Pinos	<i>F. proliferatum</i>	Delgada, plana, ligera e irregular	Rosado	Matiz amarillo-naranja (OOY) 2°-19
El Coyote	<i>F. oxysporum</i>	Liso, delgado	Blanco	Cambio del sustrato al segundo día, color purpura oscuro (UV) 8°-4
Viva	<i>Fusarium n.sp.</i>	Esponjoso, abundante micelio, apariencia algodonosa	Durazno	Anaranjado 10°-17



Figura 12. Aspecto de la colonia del aislamiento Angostura en PDA.



Figura 13. Aspecto de la colonia del aislamiento Candelaria en PDA



Figura 14. Aspecto de la colonia del aislamiento Los Pinos en PDA.

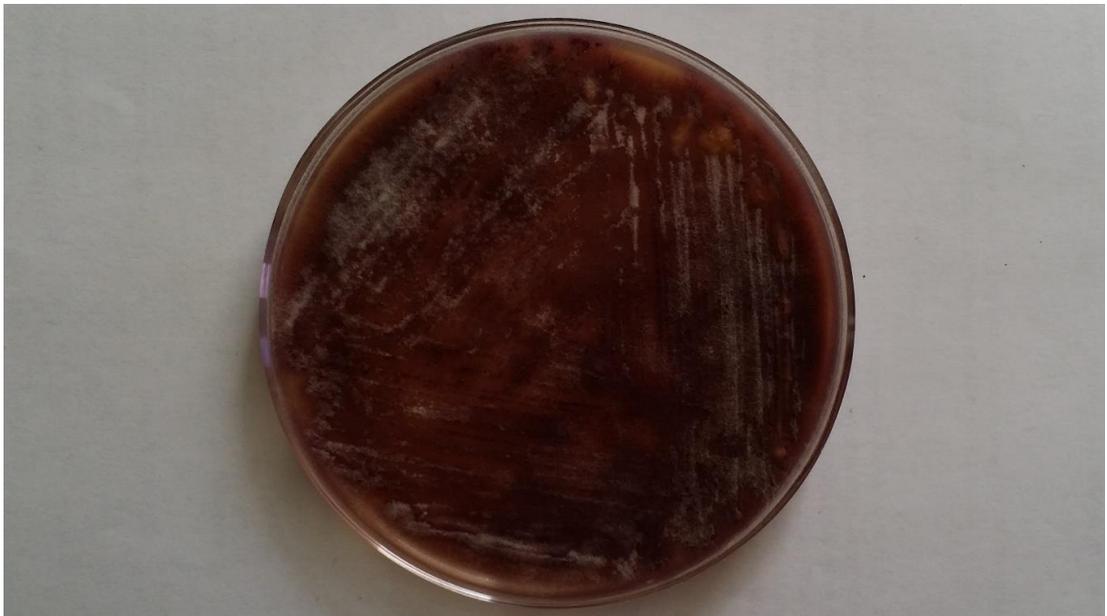


Figura 15. Aspecto de la colonia del aislamiento Coyote en PDA



Figura 16. Aspecto de la colonia del aislamiento Viva en PDA.

### 6.3.2 Producción de pigmentos

Candelaria y Angostura que se identificaron como *F. proliferatum* mostraron producción de pigmentos purpuras pero no en forma extensiva sobre la caja petri. En el caso del aislamiento Los Pinos el cual se identificó también como *F. proliferatum* observamos una variación interespecífica ya que en este aislamiento no se observó la pigmentación purpura manchada. Para este aislamiento se observó una pigmentación de amarillo a naranja. El aislamiento El Coyote presentó la típica coloración purpura intensa reportada por Longino, *et al* 2012 para *F. oxysporum*. La pigmentación fue extensa sobre la caja petri, como se observa en la Figura 20. En el caso del aislamiento Viva este presentó una coloración de naranja a naranja intenso (Tabla 5).

La pigmentación de la colonia es una característica secundaria de identificación de *Fusarium* spp. En resumen, solo en el caso del Coyote identificado como *F. oxysporum* f. sp. *meniscoideum* se puede diferenciar claramente de los otros cuatro aislamientos en base a la característica cultural de pigmentación. Debemos de recordar que la pigmentación de las colonias que han sido desarrolladas en medios ricos en carbohidratos puede ser variable en algunas especies. Las variaciones en los nutrientes, el uso de

antibióticos en los medios de cultivo, la presencia de contaminaciones bacterianas y los cambios genéticos introducidos durante la preservación de las cepas, entre otros, también pueden causar la reducción de la producción de pigmento, entre otras variaciones (López *et al* 2004; Nelson *et al.*, 1994). Por lo tanto estos resultados son válidos y para condiciones específicas como al uso de PDA, sin sellar y bajo condiciones de 8 h luz y 12 de oscuridad.

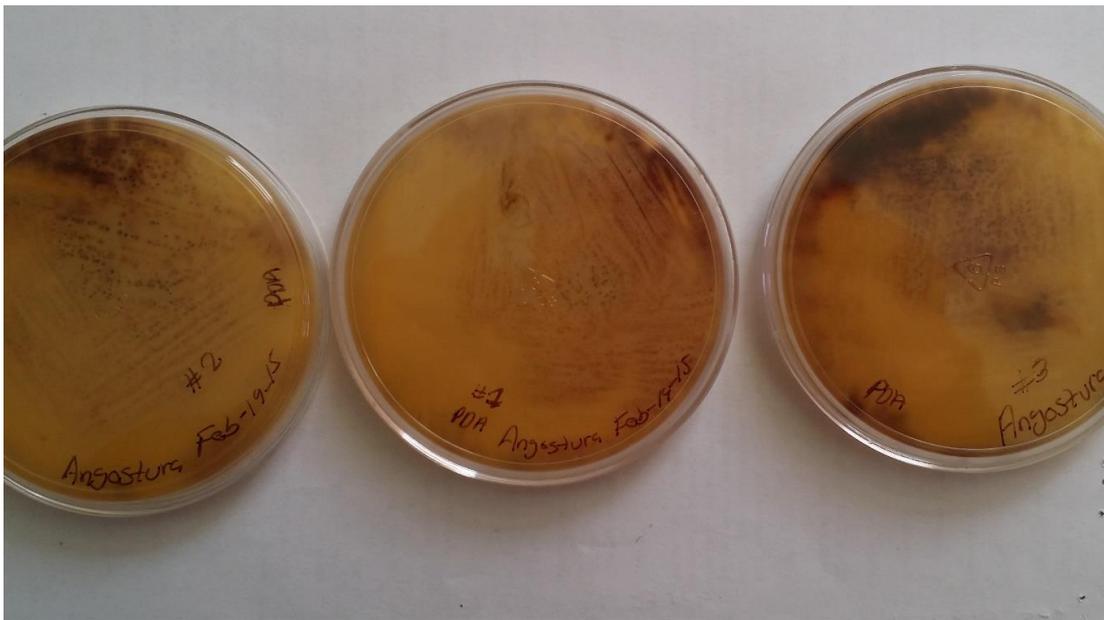


Figura 17. Aislamiento Angostura sembrado en PDA mostrando pigmentación.

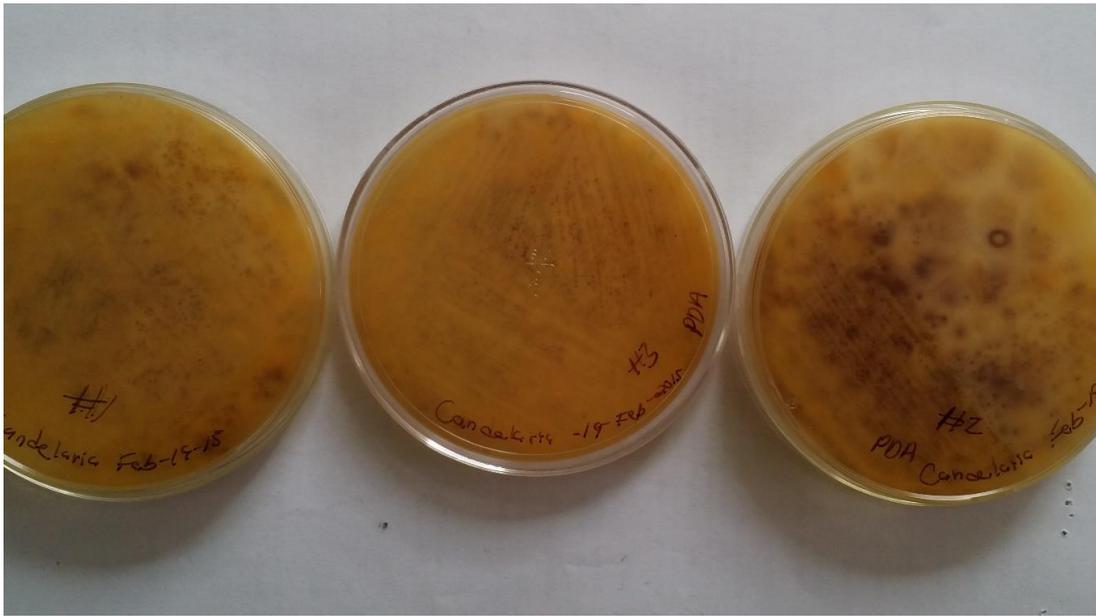


Figura 18. Aislamiento Candalaria sembrado en PDA mostrando pigmentación.

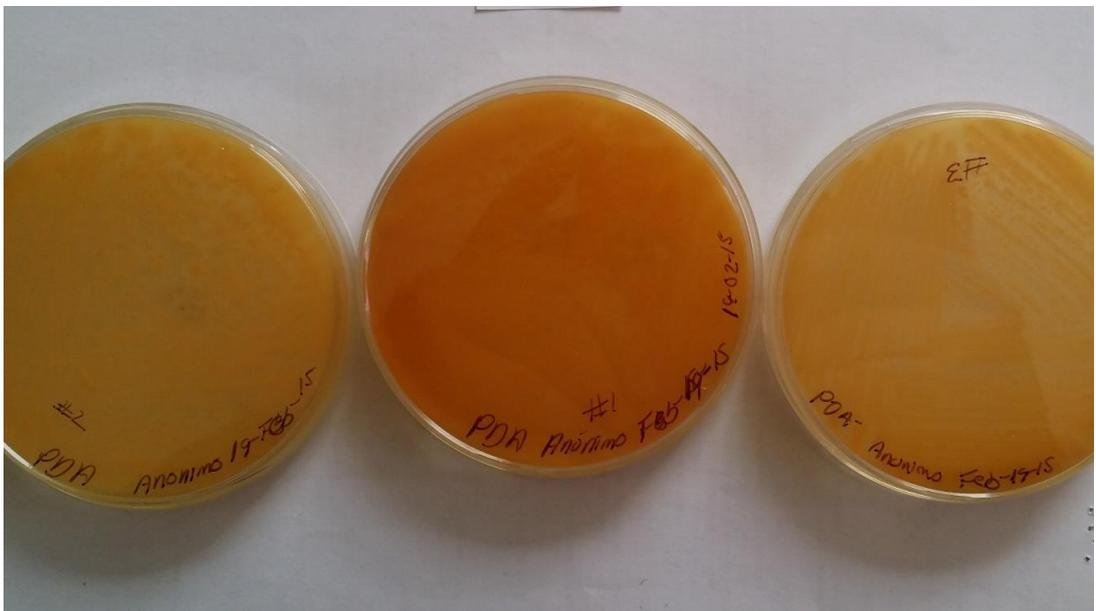


Figura 19. Aislamiento Los Pinos sembrado en PDA mostrando pigmentación.

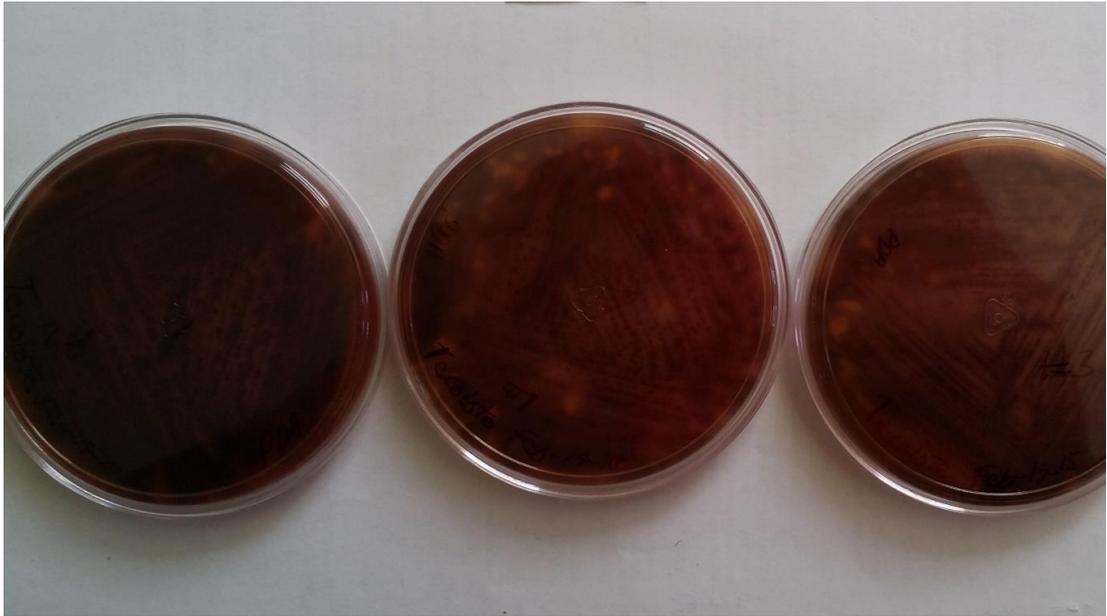


Figura 20. Aislamiento Coyote sembrado en PDA mostrando pigmentación.

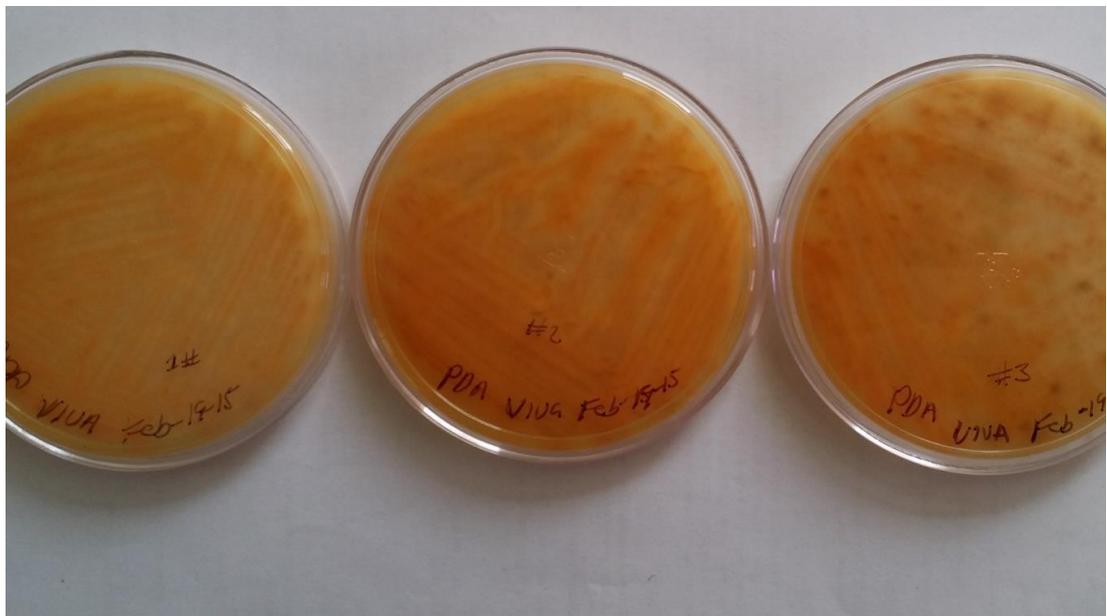


Figura 21. Aislamiento Viva sembrado en PDA mostrando pigmentación.

## 6.4 Caracterización morfológica de los aislamientos

### 6.4.1 Caracterización de longitud, ancho y forma de las microconidias

El tipo y forma de las microconidias para Angostura, Candelaria y Los Pinos (*F. proliferatum*) fueron uniceluladas en su mayoría. El porcentaje de microconidias biceluladas varió entre estos aislamientos (8%, 22.6% y 39.3% respectivamente) a pesar de ser la misma especie (Tabla 6). Con respecto a la forma de la microconidias en estos aislamientos se clasificaron en la categoría oval (Figura 8 y 21). En la Tabla 7 no se observa diferencia significativa con respecto a la longitud y ancho de la microconidia en los aislamientos Angostura, Candelaria y Los Pinos (7.4 x 2.77, 5.9 x 2.4 y 6.1 x 2.5  $\mu\text{m}$  respectivamente) lo cual concuerda con el hecho de que para estos tres aislamientos se determinó molecularmente que se trata de la misma especie: *F. proliferatum*, por lo que es de esperarse que exista similitud en sus características morfológicas.

Para el aislamiento el Coyote la mayoría de las microconidias fueron ovales (99%) y uniceluladas (98.6. %). Solo 1.4% del total de las microconidias observadas fueron biceluladas. Coyote se identificó como *Fusarium oxysporum*. Con respecto al largo y ancho de las microconidias de este aislamiento midió en promedio 8.7 x 3.5 $\mu\text{m}$  (rango 3.7-23  $\mu\text{m}$  de longitud y un ancho entre 2.1-5.6  $\mu\text{m}$ ) siendo el aislamiento que mostró las microconidias más grandes (Tabla 7). Estos datos están ligeramente arriba de lo citado por Djeugap *et al.*, en 2017 reportó el promedio del largo y ancho de microconidias en 3 aislamientos de *Fusarium oxysporum* desarrollado en PDA a 21 °C y obtuvo valores del largo con rango desde 3-19  $\mu\text{m}$  de longitud y de ancho en un rango entre 1.7 -4.4  $\mu\text{m}$ .

El aislamiento Viva (*Fusarium nsp.*) presentó las microconidias más cortas (4.4  $\mu\text{m}$ ) en comparación a los otros 4 aislamientos (Angostura 7.4  $\mu\text{m}$ , Candelaria 5.9  $\mu\text{m}$ , Los Pinos 6.1  $\mu\text{m}$  y Coyote 8.7  $\mu\text{m}$ ) (Tabla 7).

Tabla 6. Caracterización de microconidias de acuerdo a su forma, uniceluladas, biceluladas y triceluladas en los 5 aislamientos de *Fusarium* spp.

<b>Aislamiento</b>	<b>Microconidias Uniceluladas</b>	<b>Microconidias Biceluladas</b>	<b>Microconidias Triceluladas</b>	<b>Forma</b>
Angostura	92%	8%	.	Oval (57.9%)
Candelaria	76%	22.6%	1.3%	Oval (91.2%)
Los Pinos	60.6%	39.3%	-	Oval (91.9%)
Coyote	99%	1%	-	Oval (99%)
Viva	97%	1.3%	1.6%	Oval (95%)

Tabla 7. Longitud y ancho de microconidias de 5 aislamientos de *Fusarium* spp.

<b>Aislamiento</b>	<b>Longitud microconidia (µm)</b>	<b>Ancho Microconidia (µm)</b>
Angostura	7.47	2.77
Candelaria	5.97	2.40
Los Pinos	6.10	2.50
Coyote	8.70	3.53
Viva	4.47	2.77

#### **6.4.2. Caracterización de longitud, ancho, número de septos y forma de las macroconidias**

Bajo la condición de nuestro experimento 12h de luz blanca /12 h de oscuridad a temperatura ambiente, la observación de macroconidias fue difícil ya que se produjeron de forma muy escasa en los 5 aislamientos. Se probaron diversos medios de cultivo basados en la literatura que incitan a la producción de macroconidias como el medios de cultivo PDA, PD, agar V8, CLA, SNA y Agua sucrosa 1% (Leslie *et al.*, 2006; Herrera *et al.*, 2012). López *et al.*, (2004) menciona como diferentes autores como Gerlach y Ninberg (1982), Nelson *et al.* (1983) y Nirenberg (1982) reportan dificultad de *F. proliferatum* para formar macroconidios sin la presencia de luz cercana a la ultravioleta (UV) y menciona también como el empleo de medios ricos en carbohidratos, variaciones en los nutrientes, el uso de antibióticos en los medios de cultivo, la presencia de contaminaciones bacterianas y los cambios genéticos introducidos durante la preservación de las cepas, entre otros, pueden afectar la expresión de caracteres importantes y el cultivo puede manifestar una lenta velocidad de crecimiento, abundante micelio aéreo, escasez de macroconidias (por mutaciones del cultivo) y reducción de la producción de pigmento, entre otras variaciones. Nuestros cultivos se iniciaron a partir de una sola espora para reducir el riesgo a mutaciones, durante la reproducción de los cultivos no se utilizaron antibióticos y no se tuvieron problemas con contaminaciones bacteriana por lo que es difícil determinar si naturalmente estos aislamientos producen baja cantidad de macroconidias como lo reporta López *et al.*, (2004); Nelson *et al.*, (1983) y Nelson *et al.*, (1994) o si fue debido a otro(s) de los factores mencionados.

El aislamiento Viva mostró una clara diferencia estadística en la longitud y ancho de sus macroconidias comparado con los otros 4 aislamientos correspondientes a las especies *F. proliferatum* y *F. oxysporum* (Tabla 9). No observamos diferencias entre los 5 aislamientos en lo correspondiente al número de septos, forma de la célula apical y forma de la célula basal entre los 5 aislamientos (Tabla 8).

Tabla 8. Caracterización de número de septos, forma de la célula apical y basal de las macroconidias de 5 aislamientos de *Fusarium* spp.

<b>Aislamiento</b>	<b>Forma Célula apical</b>	<b>Forma Célula basal</b>	<b>Número de septos</b>
Angostura	Chata/papilada	Ligera muesca	4 (90%)
Candelaria	Chata	Ligera muesca	4 (90%)
Los Pinos	Chata/papilada	Ligera muesca	4 (100%)
Coyote	Chata/papilada	Ligera muesca	4 (80%)
Viva	Chata/papilada	Ligera muesca	4 (60%)

Tabla 9. Longitud y ancho de las macroconidias de 5 aislamientos de *Fusarium* spp.

<b>Aislamiento</b>	<b>Media Longitud macroconidia (µm)</b>	<b>Media Ancho macroconidia (µm)</b>
Angostura	41.8	3.8
Candelaria	44.3	3.2
Los Pinos	33.09	3.8
Coyote	34.7	3.5
Viva	15	1.9

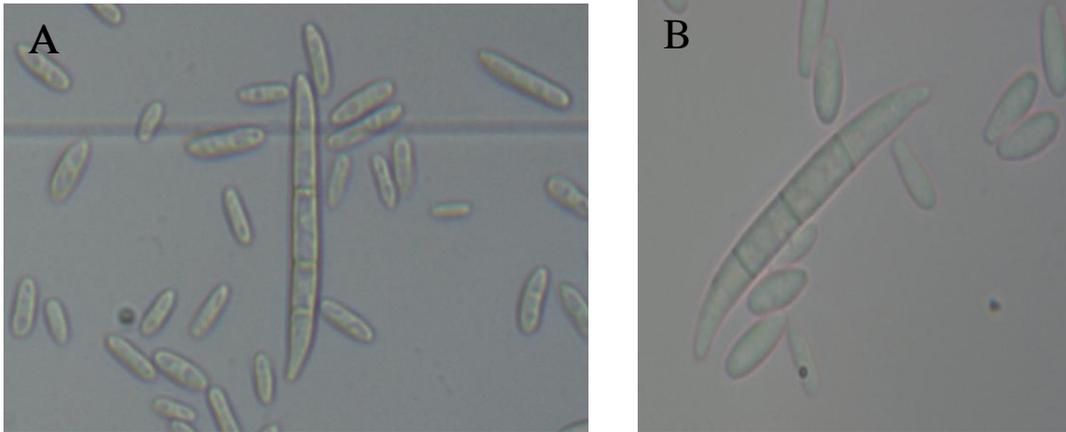


Figura 22. Aspecto de Macroconidias y microconidias (100X) A. Viva (*Fusarium* nsp.) B. Coyote (*F. oxysporum*)

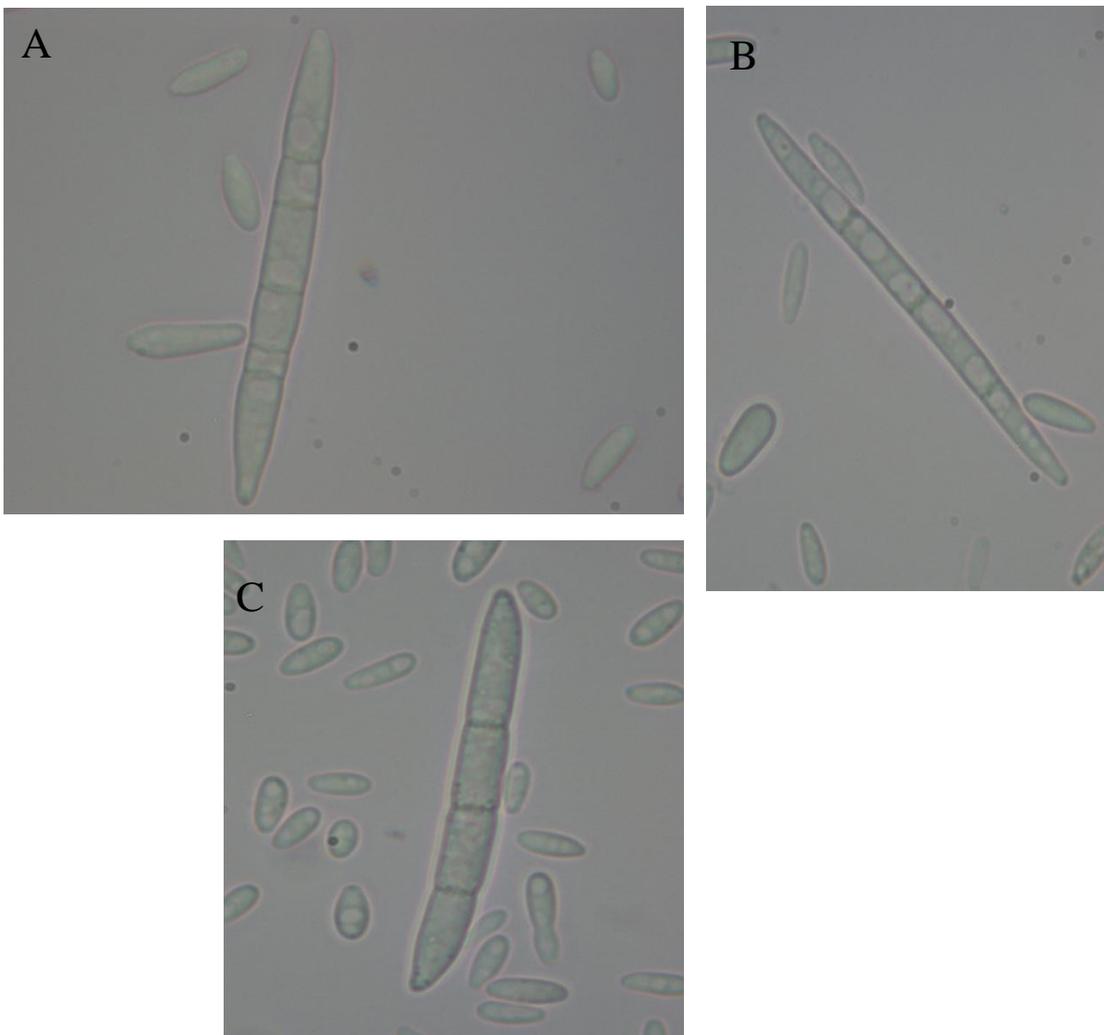


Figura 23. Aspecto de Macroconidias y microconidias aislamiento A. Angostura (*F. proliferatum*), B. Los Pinos (*F. proliferatum*), C. Candelaria (*F. proliferatum*). (100X)

Djeugap *et al.*, en 2017 reportó en un estudio de 3 aislamientos de *Fusarium oxysporum* (FOBR-049L, FOBR-164S y FOHP-121L) el promedio de largo y ancho de macroconidias desarrolladas en PDA a 21°C y obtuvo valores del ancho que variaban entre 3.1 hasta 4.4  $\mu\text{m}$  y los valores del largo de las macroconidias variaron entre 21  $\mu\text{m}$  hasta 42.2  $\mu\text{m}$ , lo que coincide con el rango de valores encontrados en esta investigación para el aislamiento Coyote el cual fue identificado como *Fusarium oxysporum*.

#### 6.4.3. Caracterización de la presencia o ausencia de clamidosporas

La presencia o ausencia de clamidosporas es una característica primaria en la taxonomía de las especies de *Fusarium*. De los 5 aislamientos únicamente El Coyote identificado como *F. oxysporum* presentó clamidosporas, lo cual coincide con la descripción morfológica de la especie. Los aislamientos Angostura, Candelaria, Los Pinos, identificados como *F. proliferatum*, no presentaron clamidosporas en ninguno de los medios usados (agar suelo, Sucrosa 1%, agar verde de Malaquita) lo cual coincide con la descripción morfológica de esta especie (Bennett *et al.*, 2013; Goyal *et al.*, 1973; Hsu *et al.*, 1972; Leslie *et al.*, 2006). En el caso del aislamiento Viva no observamos la presencia de clamidosporas en ninguno de los medios de cultivo evaluados (Figura 24; Tabla 10).



Figura 24. Clamidosporas en cadena observadas en el aislamiento Coyote (*F. oxysporum*) desarrollado en PDA después de 30 días.

Tabla 10. Caracterización de forma y tamaño de clamidosporas para cinco aislamientos de *Fusarium* spp.

Aislamiento	Clamidosporas
Angostura	Ausentes
Candelaria	Ausentes
Los Pinos	Ausentes
Coyote	Presentes en cadenas de 2 y 3 clamidosporas
Viva	Ausentes

#### 6.4.4. Caracterización de tipo de Fiálides

La morfología de los conidióforos que llevan las microconidias es una característica taxonómica primaria (Figura X). Estos conidióforos pueden ser solo monofialides o pueden ser monofialides o polifialides (Nelson *et al.*, 1994). En esta investigación los 5 aislamientos presentaron monofialides cortas y largas y también polifialides. No se tomaron medidas o datos de descripción pero en general todos los aislamientos fueron parecidos en este respecto, estas se observaron también a partir de las 72 hr. Fotografías tanto de las monofialides como las polifialides para cada uno de los aislamientos se presentan en las Figuras 23-27.

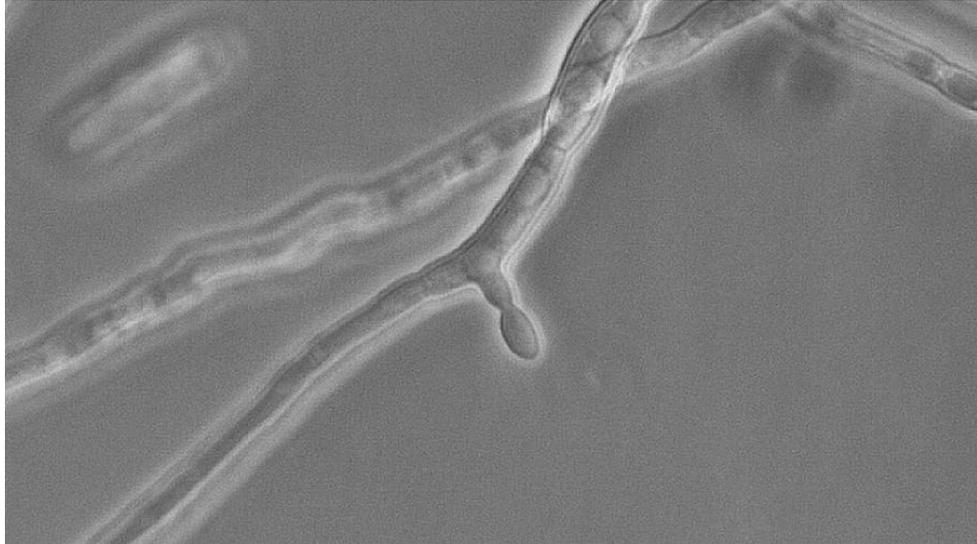


Figura 25. Monofiálide corta observada en el aislamiento Angostura (*F. proliferatum*) (40x).

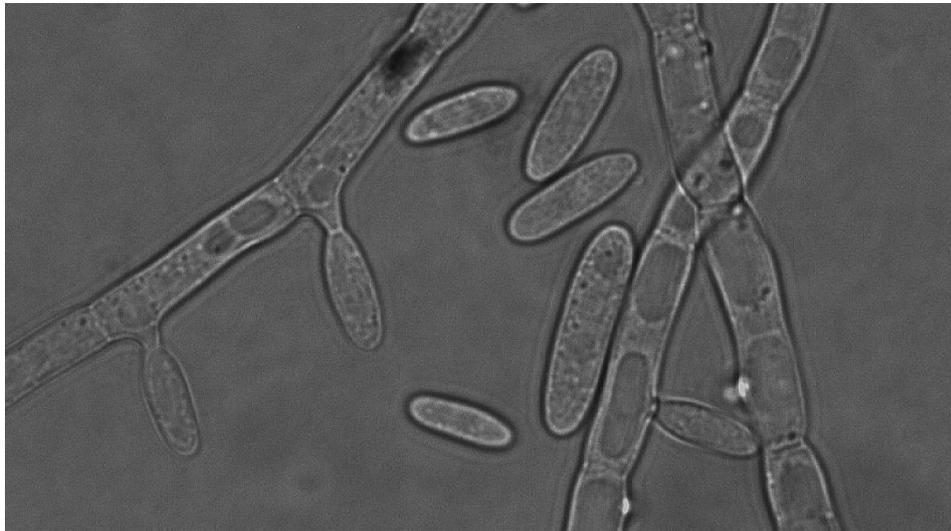


Figura 26. Monofiálide corta observada en el aislamiento Viva (*Fusarium* nsp.) (40x).

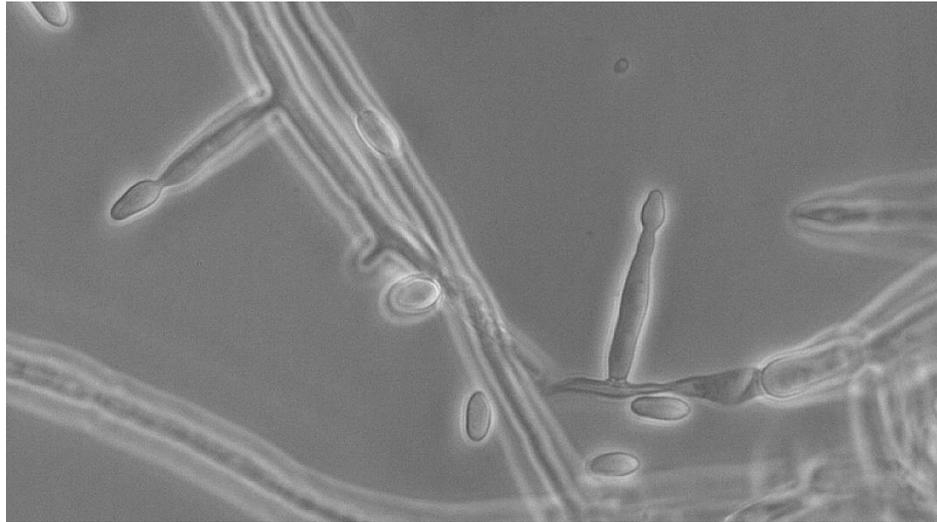


Figura 27. Monofiálide larga observada en el aislamiento Coyote (*F. oxysporum*) (40x).



Figura 28. Polifiálide observada en el aislamiento Angostura (*F. proliferatum*) (100x).

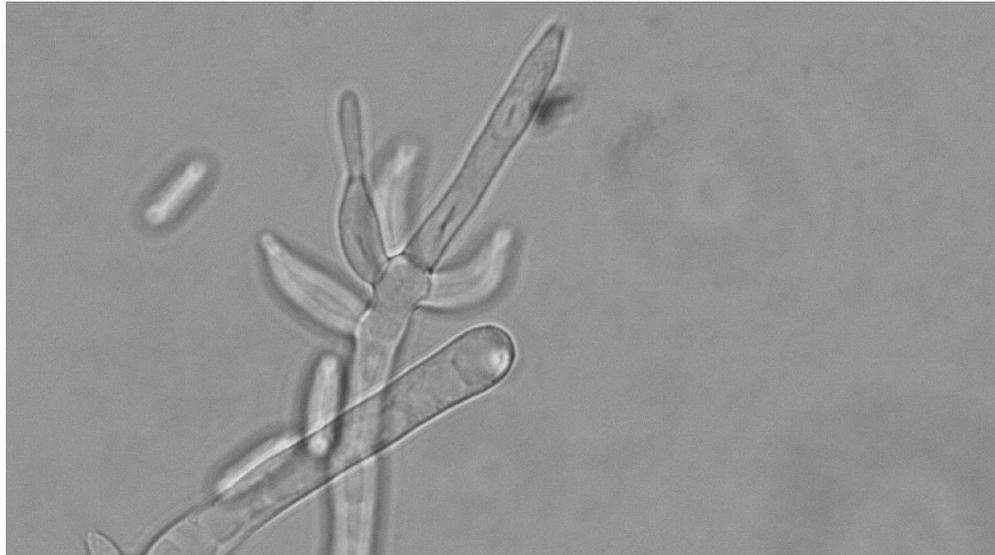


Figura 29. Polifialide observada en el aislamiento Viva (*Fusarium nsp.*) (40x).

## 6.5. Caracterización Fisiológica de los Aislamientos

### 6.5.1. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento radial total de los aislamientos de *Fusarium spp.*

Ninguno de los aislamientos presentó crecimiento radial bajo las temperaturas de 3°C, 9°C y 39°C. A 15°C, Angostura, Candelaria y Los Pinos presentaron un crecimiento radial de la colonia promedio de 3.1, 3.1 y 2.9 cm respectivamente. El Coyote presentó un crecimiento radial también débil con un promedio de 2.4 cm después de siete días. En el caso de Viva, no se observó crecimiento a 15°C. El crecimiento radial a 21 °C el crecimiento de los 5 aislamientos fue en general mayor que a 3°C, 9°C, 15°C y 39°C. Los aislamientos Angostura y Los Pinos presentaron el mayor crecimiento radial a 21°C (5.3 y 5.1 cm respectivamente). El Coyote y el Viva presentaron crecimiento radial similar (4.6 y 4.5 cm respectivamente) (Tabla 11).

Angostura, Candelaria y Los Pinos variaron entre sí en su respuesta a 27°C presentando un crecimiento radial promedio después de 7 días de 7.2, 5.8 y 6.2 cm respectivamente. El Coyote tuvo un promedio de 6.9 cm de crecimiento radial mientras en el caso de Viva 5.4 cm a los 7 días. A 33°C, los aislamientos Angostura, Candelaria y Los Pinos presentaron crecimiento

radial promedio de 6.0, 4.9 y 5.2 respectivamente. El Coyote mostró una reducción de crecimiento dramática con un promedio radial de la colonia de 1.0 cm, mientras que en el caso de Viva el promedio de crecimiento después de 7 días fue 5.3.

Cuando los 5 aislamientos fueron desarrollados a 3°C, 9°C, no hubo crecimiento de las colonias y esto ocurrió en cada una de las 3 repeticiones de este experimento. Conforme la temperatura fue incrementándose, se incrementó paulatinamente el crecimiento. El mayor crecimiento radial de la colonia para los 5 aislamientos se obtuvo a temperatura de 27°C. Nuevamente conforme la temperatura comenzó a incrementarse a partir de los 27 °C, el crecimiento decreció hasta llegar a cero a los 39°C. El aislamiento Coyote identificado como *F. oxysporum* pareció ser el aislamiento que respondió en forma más marcada a los cambios de temperatura de los 5 aislamientos, ya que se observó incrementos a partir de los 15°C entre 2 y 4 cm de diferencia y al llegar a los 33°C el crecimiento se redujo abruptamente (1.0 cm). En el caso de los aislamientos de Angostura, Candelaria y Los Pinos identificados como *F. proliferatum* en general podemos decir que no variaron en crecimiento tan drásticamente como *F. oxysporum* a los cambios de temperatura. Por último el aislamiento Viva identificado como una especie novel de *Fusarium* en espárrago, creció a partir de los 21°C, pareció no ver afectado su crecimiento con variaciones de temperatura entre 27 °C y 33 °C (Tabla 11).

Tabla 11. Crecimiento radial de la colonia de 5 aislamientos de *Fusarium* spp. a seis temperaturas por 7 días.

Aislamiento/Temperatura	3°C	9°C	15°C	21°C	27°C	33°C
Angostura	0	0	3.1 cm	5.3 cm	7.2 cm	6.0 cm
Candelaria	0	0	3.1 cm	4.3 cm	5.8 cm	4.9 cm
Los Pinos	0	0	2.9 cm	5.1 cm	6.2 cm	5.2 cm
Coyote	0	0	2.4 cm	4.6 cm	6.9 cm	1.0 cm
Viva	0	0	0	4.5 cm	5.4 cm	5.3 cm

### 6.5.2 Efecto del fotoperiodo (luz blanca, luz ultravioleta y oscuridad) sobre el crecimiento radial total de los aislamientos de *Fusarium* spp.

Los aislamientos Angostura, Candelaria y Los Pinos cultivados en V8, no presentaron diferencias estadísticas significativas entre ellos con respecto al crecimiento radial de la colonia (7.8, 7.9 y 7.8 respectivamente) expuestos a 24h de luz blanca. Coyote fue el que presentó menor crecimiento radial (7.4) a este fotoperiodo y el aislamiento Viva presentó el mayor crecimiento radial (8.0 cm). No hubo diferencia significativa en el crecimiento radial entre los 5 aislamientos (Figura 28; Tabla 12).

Bajo condiciones de 24 h de luz ultravioleta, los aislamientos Angostura, Candelaria y Los Pinos (8, 7.7 y 7.2 cm respectivamente) identificadas como *F. proliferatum* presentaron un crecimiento similar a el Coyote identificado como *F. oxysporium* (7.3 cm) y al aislamiento Viva identificado como *Fusarium* nsp. (7.9 cm) después de 7 días. No hubo diferencia significativa (Figura 8). No hubo diferencias significativas en el crecimiento radial de las colonias después de ser desarrolladas en la oscuridad por 24 h al final de 7 días (Figura 29, Tabla 12).

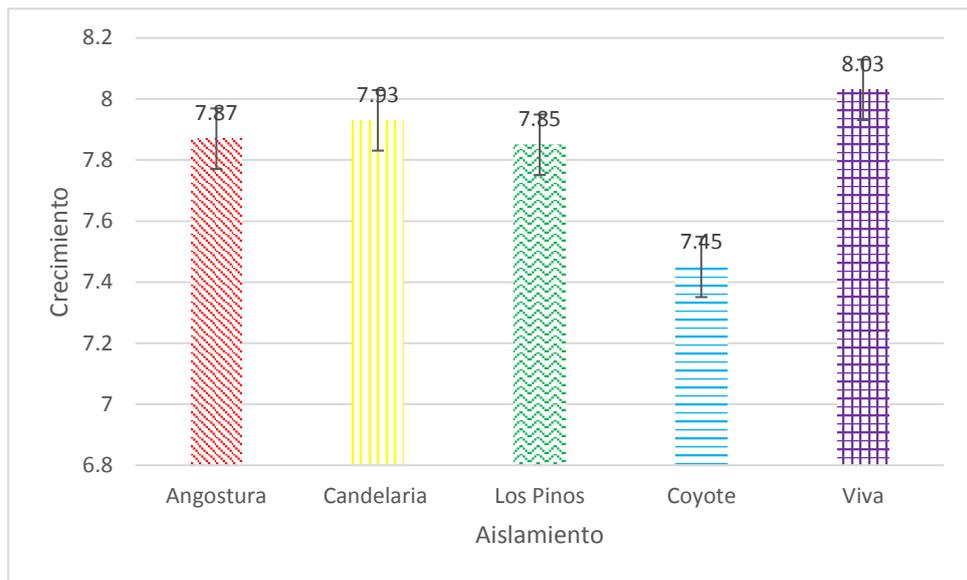


Figura 30. Comparación del crecimiento radial después de 7 días de 5 aislamientos de *Fusarium* spp. bajo condiciones de 24 h de luz blanca en medio V8.

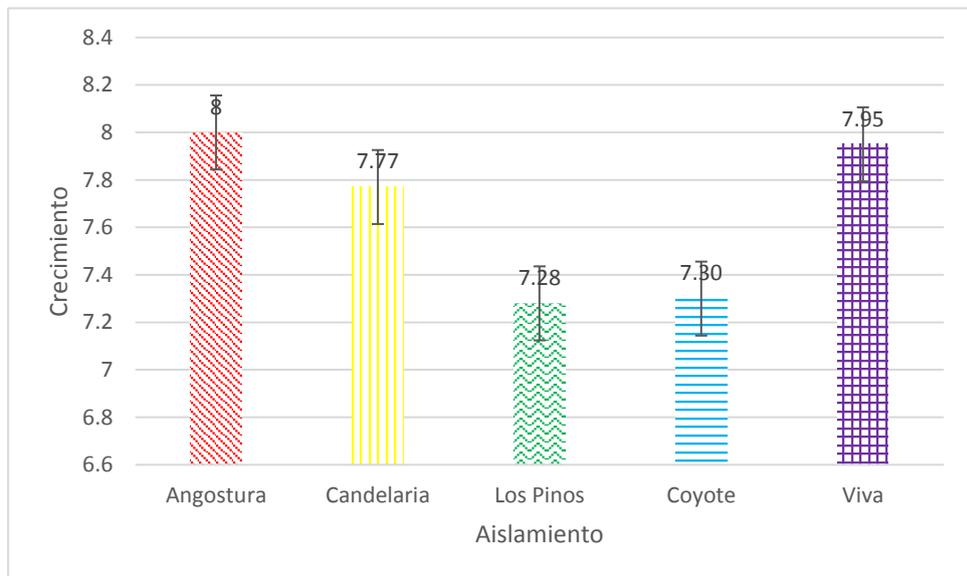


Figura 31. Comparación del crecimiento radial después de 7 días de 5 aislamientos de *Fusarium* spp. bajo condiciones de luz ultravioleta 24 h en medio V8.

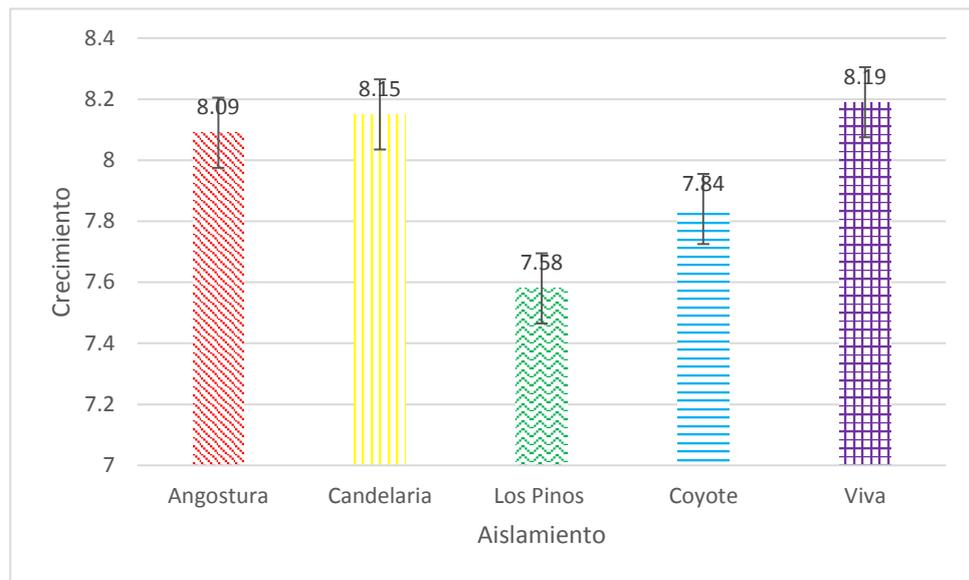


Figura 32. Comparación del crecimiento después de 7 días de 5 aislamientos de *Fusarium* spp. bajo condiciones de 24 h de oscuridad en medio V8.

Tabla 12. Crecimiento radial de la colonia de 5 aislamientos de *Fusarium* spp. bajo diferentes fotoperiodos por 7 días.

Aislamiento	Luz blanca/ Crecimiento radial (cm)	Luz ultravioleta/ Crecimiento radial (cm)	Oscuridad/ Crecimiento radial
Angostura	7.8	8.0	8.0
Candelaria	7.9	7.7	8.1
Los Pinos	7.8	7.2	7.5
Coyote	7.4	7.3	7.8
Viva	8.0	7.9	8.1

No encontramos diferencia estadística entre los 3 diferentes tipos de fotoperiodo (luz blanca, luz ultravioleta y oscuridad) para cada uno de los 5 aislamientos con respecto al crecimiento radial de la colonia después de 7

días de exposición. La mayoría de los aislamientos presentaron mayor crecimiento radial en oscuridad (Figura 29: Tabla 12). No se cuantificó la producción de conidias bajo los diferentes fotoperiodos pero sí se observó que las cajas petri que estaban bajo condiciones de luz ultravioleta se observaban mucho más esporuladas.

### **6.5.3 Efecto del pH sobre el crecimiento radial total de los aislamientos de *Fusarium* spp.**

Los aislamientos Angostura, Candelaria y Los Pinos fueron identificadas como *F. proliferatum* y coincidieron en que el pH 7 fue donde presentó el mayor crecimiento radial del hongo. Los tres aislamientos también coincidieron en tener menor crecimiento a pH ácidos de 6 y 5 aunque en diferentes proporciones.

En forma general podemos concluir que todos los aislamientos presentaron un mayor crecimiento a un pH 7. Estas diferencias no fueron estadísticamente diferentes en ninguno de los 6 diferentes pH. Estos resultados coinciden con lo citado por López, 2004 en la que cita que la mayoría de las especies de *Fusarium* pueden crecer en un amplio rango de hospederas que presentan valores de pH desde 2 hasta 9 o mayores. El autor también establece que el crecimiento de muchas especies cambia el pH del medio lo cual dependería de la composición del medio y otras condiciones del cultivo. En nuestro caso se ajustó el pH antes de esterilizar y de nuevo en el momento del vaciado de las cajas Petri. La esterilización no afectó el pH de los medios preparados (Figura 31-32, Tabla 13).

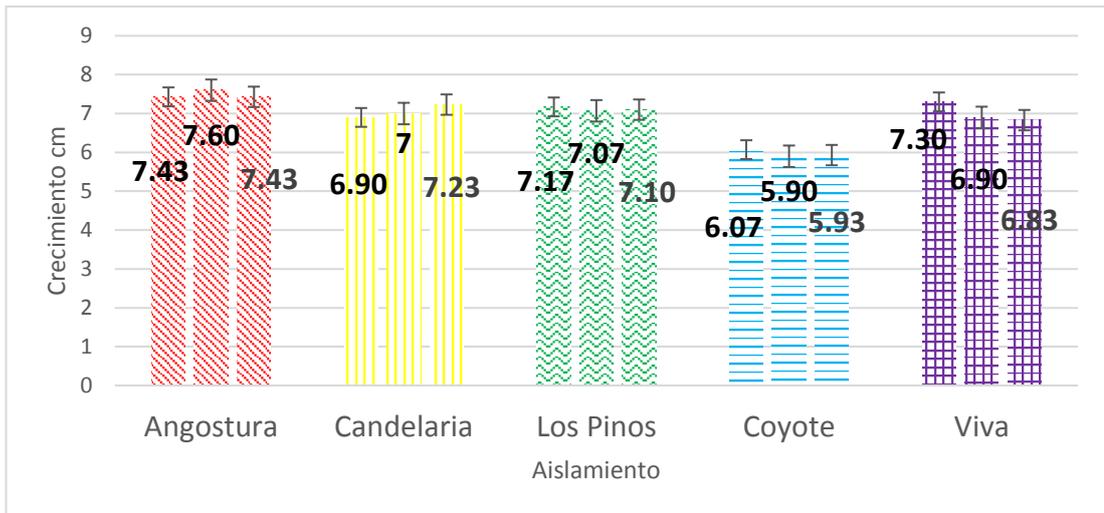


Figura 33. Comparación de crecimiento radial de 5 aislamientos de *Fusarium* spp. a pH 5, 6 y 7.

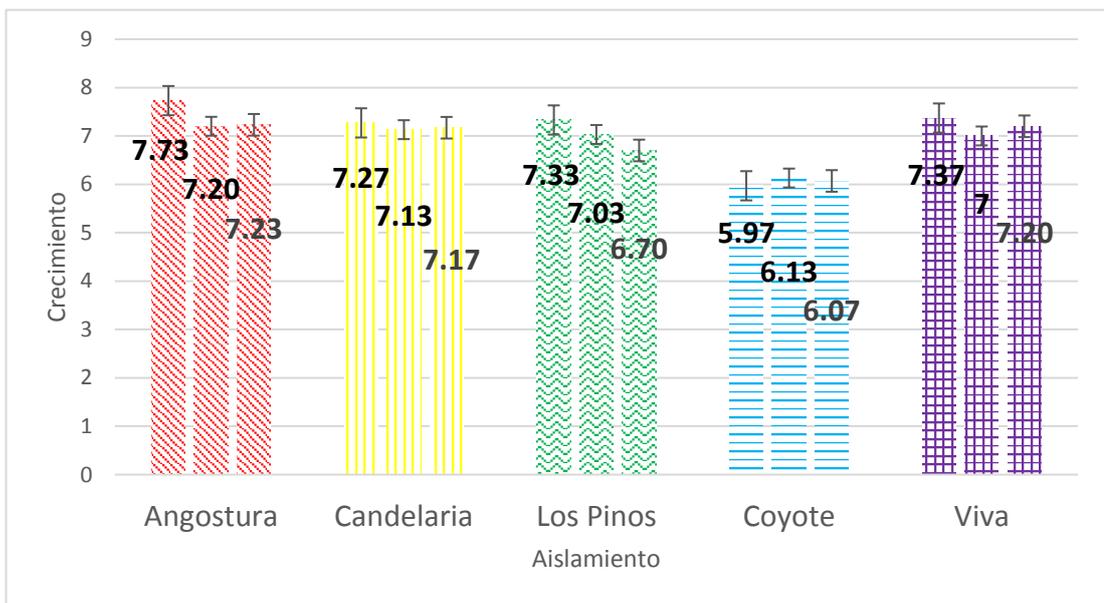


Figura 34. Comparación de crecimiento radial de 5 aislamientos de *Fusarium* spp. a pH 8, 9 y 10.

Tabla 13. Crecimiento radial de 5 aislamientos de *Fusarium* spp. en medio V-8 a seis diferentes pH después de siete días (cm)

Aislamiento	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9	pH 10
Angostura	7.4	7.6	7.4	7.7	7.2	7.2
Candelaria	6.9	7.0	7.2	7.2	7.1	7.1
Los Pinos	7.1	7.0	7.1	7.3	7.0	6.7
Coyote	6.0	5.9	5.9	5.9	6.1	6.0
Viva	7.3	6.9	6.8	7.3	7.0	7.2

En los experimentos sobre el efecto del pH del medio sobre el crecimiento radial del aislamiento, se midió solo el crecimiento radial. En otros experimentos similares algunos investigadores (López *et al.*, 2004; Srivastava *et al.*, 2011) midieron la biomasa, lo cual deberíamos considerar en experimentos futuros como ya que la productividad en términos de producción de biomasa determina la aptitud de los organismos en un ecosistema o medio determinado.

#### 6.6. Caracterización Físico–Química del suelo de las áreas muestreadas

Se realizaron análisis físico-químicos y nutricionales de los suelos de los cuales se originaron nuestros aislamientos, con la finalidad de determinar la existencia de factores relacionados con el suelo los cuales pudieran tener un impacto negativo en el crecimiento de las plantas, que podrían actuar independientemente o sinérgicamente. En contraste con la universalidad de *Fusarium* spp. en los suelos, la incidencia de FCRR es generalmente localizada y esporádica esto sugiere que existen un conjunto de condiciones ecológicas que influyen en el desarrollo de la enfermedad. El pH bajo del suelo y la textura fina de este, así como el drenaje inadecuado favorecen la presencia de esta enfermedad, en estudios citados por Hamel (2005). En nuestra investigación los suelos presentaron un pH entre 7.0 y 7.4. y de textura franco arenosa (para Candelaria, Los Pinos, Coyote y Viva) y para Angostura fue arenoso franco. Los suelos franco arenosos tienen mucho drenaje (no hay encharcamiento de agua), buena aireación (lo que puede favorecer la

sobrevivencia de organismos) pero no mantienen bien los nutrientes. De acuerdo con Nonnecke citado por Hamel (2005) el magnesio (Mg) parece ser el único nutriente deficiente relacionado con campos infestados y esta condición se asoció con una elevada proporción de potasio K:Mg. Los análisis de nutrición de los suelos muestreados para esta investigación muestran porcentajes de magnesio dentro del rango normal (10 a 20%) para Angostura (12.7%), Candelaria (19.2%) y Coyote (13.2%) y bajos para Los Pinos (7.1%) y Viva (7.5%). Estos mismos autores mencionan que la alta cantidad de materia orgánica del suelo (MO), la alta capacidad de retención de agua y a veces el alto contenido de arcilla se asoció con una baja incidencia de la enfermedad excepto cuando el drenaje era pobre. Un porcentaje de materia orgánica entre el 2-4% se considera adecuado. El Campo Los Pinos (dónde se aisló *F. proliferatum*) presentó un porcentaje de MO de 2.69%. La Angostura y Candelaria (*F. proliferatum*) presentaron (1.65 y 0.69% MO respectivamente), Coyote (*F. oxysporum*) 1.5% de MO y finalmente Viva (*Fusarium* nsp.) 1.72% de MO. La alta cantidad de MO en un suelo lo acidifica y también promueve la presencia de otros microorganismos que pueden ser antagónicos o competitivos a *Fusarium* spp., por lo que en este caso el bajo contenido de MO en los suelos de donde provienen nuestros aislados Laporta condiciones ecológicas favorables para el desarrollo de *Fusarium* spp. La enfermedad FCRR en el espárrago parece ser provocada por varios factores relacionados con el suelo los cuales pueden tener un impacto negativo en el crecimiento de las plantas, que podrían actuar independientemente o sinérgicamente.

Tabla 14. Parámetros físicos y químicos de los suelos muestreados

<b>Aislamiento</b>	<b>% Sat.</b>	<b>pH</b>	<b>C. E.</b>	<b>Textura</b>	<b>% M. O.</b>
Angostura	22	7.23	3.53	Arenoso Franco	1.65
Candelaria	25	7.48	4.74	Franco Arenosa	0.69
Los Pinos	22	7.07	4.13	Franco Arenosa	2.69
Coyote	28	7.04	1.67	Franco Arenosa	1.58
Viva	25	7.31	3.40	Franco Arenosa	1.72
<b>NIVELES ADECUADOS</b>	<b>20 a 40</b>	<b>7.00</b>	<b>1.5</b>	<b>Franco</b>	<b>2.00 – 4.00</b>

Tabla 15. Estado nutricional de los suelos muestreados

<b>Aislamiento</b>	<b>Ppm (mg/Kg suelo)</b>							<b>C.I.C</b>	<b>% Cationes intercambiables</b>			
	<b>N- NO<sub>3</sub></b>	<b>P</b>	<b>Ca</b>	<b>Mg</b>	<b>Na</b>	<b>K</b>	<b>mEq/ 100g</b>		<b>Ca</b>	<b>Mg</b>	<b>Na</b>	<b>K</b>
Angostura	17	47	2.860	315	270	950	20,53	69,64	12,78	5,72	11,86	
Candelaria	20	40	4.508	735	405	560	31,86	70,74	19,22	5,53	4,51	
Los Pinos	36	59	4.523	245	255	114	28,69	78,83	7,12	3,86	10,19	
Coyote	23	45	4.253	430	265	380	26,97	8,83	13,28	4,27	3,61	
Viva	31	23	4.775	280	275	00	30,99	77,03	7,53	3,86	10,19	
<b>NIVELES ADECUADOS</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>2000</b>	<b>≤25</b>	<b>250</b>	<b>350</b>	<b>5 a 50</b>	<b>70 a 80</b>	<b>10 a 20</b>	<b>&lt;8</b>	<b>5 a 10</b>	

## 7. CONCLUSIONES

- Todos los aislamientos de *Fusarium* spp. fueron patogénicos al espárrago (*Asparagus officinalis* L).
- La especie predominante en los cinco campos muestreados de la Región de Caborca fue *Fusarium proliferatum*.
- El aislamiento Viva se identificó como una nueva especie de *Fusarium* presente para espárrago en la Región de Caborca.
- Las microconidias y macroconidias variaron estadísticamente en longitud y ancho en los aislamientos, Angostura, Candelaria, Los Pinos y Coyote.
- La temperatura óptima de crecimiento para los 5 aislamientos de *Fusarium* spp se observó a 27°C.
- El fotoperiodo y pH no tuvieron efecto sobre el crecimiento de ninguno de los cinco aislamientos de *Fusarium* spp.

## 8. RECOMENDACIONES

- Es necesario realizar análisis moleculares adicionales para identificar la especie del aislamiento Viva.
- En esta investigación se colectaron solo 5 muestras por cada campo, lo que válida nuestros resultados únicamente para el área muestreada. Es necesario aumentar el número de muestras analizadas para que sea más representativo de la Región de Caborca.
- El muestreo para esta investigación fue dirigido exclusivamente a plantas sintomáticas y coronas necrosadas. Consideramos que información adicional y de importancia se obtendría si se realiza un muestreo aleatorio que incluya plantas sintomáticas y asintomáticas. Igualmente sería adecuado también muestrear diferentes partes de la planta para tener una mejor idea de la epidemiología del hongo en la planta de espárrago.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

Agrios, G. 2000. Plant Pathology. San Diego, California: Academic Press. 4th Edition. 635 pp.

Bennett, R. and R.M. Davis. 2013. Method for Rapid Production of *Fusarium oxysporum* f. sp. vasinfectum Chlamydospores. The Journal of Cotton Science 17:52–59.

Booth, C. 1977. The Genus *Fusarium*. The Commonwealth Mycological Institute. Surrey, England. 237 pp.

Correll J.C. 1991. The relationship between formae speciales, races and vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum*. Phytopatology 81(9): 1061-1064.

Chelkowski, J. 1989. *Fusarium*: mycotoxins, taxonomy and pathogenicity. Elsevier

Choi, Y.W., K.D. Hyde and W.H. Ho, 1999. Single spore isolation of fungi. Fungal Diversity 3: 29-38.

Dietert F. M, D. H. VanEtten, and S. P. Matthews 1983. *Nectria haematococca* mating population VI. Cultural parameters affecting growth, conidiation and perithecial formation. Canadian Journal of Botany. 61(4): 1178-1184.

Djeugap F. J., D. Dostaler and L. Bernier 2017. Influence of Culture Media and temperature on Growth and Sporulation of *Lasiodiplodia theobromae*, *Pestalotiopsis microspore* and *Fusarium oxysporum* Isolated from

*Ricinodendron heudelotti* in Cameroon. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 6(6):3098-3112.

Elmer, H.W. 2000. Incidence of infection of Asparagus Spears marketed in Connecticut by *Fusarium* spp. Plant Disease 84(8): 831-834.

Godina G. A.2014. La producción de espárrago en México (II). El Economista. <http://eleconomista.com.mx/columnas/agro-negocios/2014/12/09/produccion-esparrago-mexico-ii>  
[http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/distritofederal/boletines/Paginas/JAC\\_0040-28.aspx](http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/distritofederal/boletines/Paginas/JAC_0040-28.aspx). 2014. Fecha de consulta: 26-sep.-17.

González M. A. Del Pozo. 1999. El cultivo del espárrago. Boletín INIA No. 6.

Goyal, J.P., H. Maraité, and J.A. Meyer. 1973. Abundant production of chlamydospores by *Fusarium oxysporum* f.sp. melonis in soil extract with glucose. Netherlands Journal Plant Pathology. 79:162-164.

Guerrero C.E.L. Night, M. Stanghellini and W. Elmer. 1997. Incidence of *Fusarium* spp. In asparagus Spears. Plant Disease. 81(8): 957.

Guerrero Ruiz J. C. 1997. Identification and Etiology of *Fusarium* associated with asparagus Crown disease in Southern California and Northern Mexico. Ph.D. Dissertation University of Arizona.

Hamel, CH., V.Vujanovic, A. Nakano-Hylander, R. Jeannotte and M. St-Arnaud. 2005. Factors Associated with *Fusarium* Crown and Root Rot of Asparagus Outbreaks in Quebec. Phytopathology 95(8):867-873.

Herrera, I., y H. Laurentin. 2012. Evaluación de la esporulación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *sesami* en dos medios de cultivo y dos metodologías de inoculación en ajonjolí (*Sesamum indicum*) Revista Científica UDO 642 Agrícola 12 (3): 639-643.

Hsu S.C and J.L. Lockwood. 1972. Chlamydospore Formation in *Fusarium* in Sterile Salt Solutions. Michigan State University. No. 6106. 63:597-602.

Jiménez-Díaz, R. M. 2006. Fusariosis Vasculares y Verticilliosis: Situación actual y perspectivas para su control. Memorias XIII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología. Septiembre 2006. Murcia 377 pp.

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

Li-Jun Ma, D.M. Geiser, R.H. Proctor, A.P. Rooney, K. O'Donell, F. Trail, D.M. Gardiner, J.M. Manners, and K. Kazan. 2013. *Fusarium* Pathogenomics Annu. Rev. Microbiol 67:399-416.

Logrieco A., B. Doko, A. Moretti, S. Frisullo and A. Visconti. 1998. Occurrence of Fumonisin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> in *Fusarium proliferatum* infected Asparagus plants. Journal Agric Food Chem. 46: 5201- 5204.

López D. M.O. Lopez. 2004. Influencia del pH y de los medios de cultivo en la expresión de los caracteres de valor diagnóstico de las especies del género *Fusarium*. Fitosanidad. 8(3): 7-11.

López D. M.O. Lopez. 2004. Influencia de diferentes tipos de agar y del sellado de las placas sobre la pigmentación y el crecimiento micelial de las especies de *Fusarium*. Fitosanidad. 8(3): 3-6.

McKeague J.A. (Editor) 1978. Manual on soil sampling and methods of analysis 2nd edition. Canadian Society of Soil Science. 212 pp.

Minter D.W., B.C. Sutton and B.L. Brady 1983. What are phialides anyway? Trans. s-. Mycol. Soc. 81(1): 109-120.

Molinero R. L., E. Rubio, E. González Domínguez and M. J. Basallote-Ureba. 2011. Alternative Hosts for *Fusarium* spp. Causing Crown and Root Rot of Asparagus in Spain. *Journal of Phytopathology* 159:114–116.

Morrison III, W. R., J. K. Tuell, M. K. Hausbeck, and Z. Szendrei 2011. Constraints on Asparagus Production: The Association of *Ophiomyia simplex* (Diptera: Agromyzidae) and *Fusarium* spp. *Crop Science* 51:1414-1423.

Nelson, P. 1991. History of *Fusarium* Systematics *Phytopathology* 81(9): 1045-1048.

Nelson, P., R. Tousson, T. A. and W. F. Marasas.1983. *Fusarium* species An Illustrated Manual for Identification. The Pennsylvania State University Press. U.S.A. 191 pp.

Nelson P., C.M. Dignani, E.J. Anaissie 1994. Taxonomy, Biology and Clinical Aspects of *Fusarium* Species. *Clinical Microbiology Reviews* 7(4):479-504.

Nicoli, A, Zambolim L, Trazilbo J. P. J, Viera R.F, Teixtera H, and Carneiro S. J.E. Vicosá, MG. Brazil. 2013. *Tropical Plant Patología*, Vol. 38(2): 149-151, 2013.

Quilambaqui-Jara, M. E. Zavaleta-Mejía, G. Mora-Aguilera, F. Delgadillo-Sánchez, y A. Marín-Jarillo.2004. Patogenicidad de Tres Especies de *Fusarium* Asociadas con el Declinamiento del Espárrago (*Asparagus officinalis* L.) en Guanajuato, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22(1):30-35.

Rivera, O. B. 2005. Determinación de la presencia de los nemátodos entomopatógenos y la factibilidad de su uso para el manejo de la chicharra cantadora en el cultivo del espárrago *Asparagus officinalis* en la Región de Caborca Sonora. Tesis de maestría. Universidad de Sonora. México. 67 pp.

Schreuder W., and S.C. Lamprecht 1995. Pathogenicity of Three *Fusarium* species associated with Asparagus Decline in South Africa. *Plant Disease* 79(2):177-181.

Srivastava S., N. Pathak and P. Srivastava 2011. Identification of limiting factors for the optimum growth of *Fusarium oxysporum* in liquid medium. *Toxicology International* 18.2:111-116.

Summerell B.A, Salleh B and Leslie J.F. 2003. A Utilitarian Approach to *Fusarium* Identification. *Plant Disease*. 87(2): 117-128.

Thrane, U. 2001. Developments in the taxonomy of *Fusarium* species based on secondary metabolites IN *Fusarium*; Paul E. Nelson Memorial Symposium. Edited by B. A. Summerell, J. F. Leslie O. Backhouse, W.L. Bryden and L.W. Burgess. APS Press 392 pp.

Vázquez Curiel R.A. 2014. Análisis de las propiedades fisicoquímicas en los suelos cultivados con espárrago en la región de Caborca, sonora. Universidad de Sonora.

Division de ciencias administrativas contables y agropecuarias. 84 pp.

Waskiewicz A., L. Irzykowska, J. Bocianowski, Z. Karollewski, Z.Weber and P.Golinski. 2013. Fusariotoxins in asparagus-their biosynthesis and migration. *Food additives and Contaminants: Part A* 30(7):1332-1338.

Weber, Z., Z. Karolewski, L. Irzykowska, M. Knaflewski and T. Kosiada. 2007. Occurrence of *Fusarium* species in spears of asparagus (*Asparagus officinalis*). *Phytopathol. Pol.* 45: 9-15.

Windels C.E., P. M. Burnes and T. Kommedahl, 1987. Five-year preservation of *Fusarium* species on silica gel and soil. *Phytopathology*. 78(1): 107- 109.

## 10. APÉNDICES

### AGARES

#### Apéndice A. Agua-Agar 2% (WA)

Reactivo	Cantidad
Agar	20 g
Agua destilada	1000 mL

#### Apéndice B. Agar Clavel (CLA)

Reactivo	Cantidad
Hojas de clavel estéril	5-6 Trozos (3-5mm <sup>2</sup> )/Caja
Agua-Agar 2%	20 g de agar en 1000 mL de agua

- Un pedazo de clavel se agrega por cada 2 ml de medio.
- Las hojas se secan en horno aproximadamente a 70°C por 3-4 horas.

#### Apéndice C. Agar Glucosa Asparagina (GA)

Reactivo	Cantidad
D-glucosa	20 g
Asparagina	3 g
Sales de GA	50 MI
Micronutrientes Steinberg's	1 mL
Agua destila	1000 mL

<b>Sales de GA</b>	
<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
Fosfato de potasio dibásico	17.4 g
Fosfato de potasio monobásico	122.4 g
Sulfato de magnesio	2.8 g
Agua destilada	1000 mL

<b>Solución micronutriente Steinberg's</b>	
<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
Cloruro férrico hexahidratado	3.86 g
Cloruro de zinc	0.83 g
Cloruro de cobre dihidratado	0.13 g
Cloruro de cobre tetrahidratado	0.36 g
Oxido de molibdeno (85%)	0.07 g
Cloruro de calcio dihidratado	14.7 g
Agua destilada	1000 mL

#### **Apéndice D. Agar Jugo V-8**

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
CaCO <sub>3</sub>	3.0 g
Agar	20 g
Jugo V-8	200 mL
Agua destilada	800 mL

#### **Apéndice E. Agar KCl**

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
Bacto Agar	20 g
KCl	5 g
Agua destilada	1000 mL

### Apéndice F. Agar-Papa Dextrosa (PDA)

Reactivo	Cantidad
Caldo Papa	12 g
Agar	7.5 g
Agua destilada estéril	500 mL

### Apéndice G. Agar Spezieller Nährstoffarmer (SNA)

Reactivo	Cantidad
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1 g
$\text{KNO}_3$	1 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5 g
KCl	0.5 g
Glucosa (dextrosa)	0.2 g
Sucrosa	0.2 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 mL

### Apéndice H. Agar Suelo (SA)

Reactivo	Cantidad
Tierra	250 g
Agar	7.5 g
Agua destilada	500 mL

### Apéndice I. Agar Verde de Malaquita (MGA)

Reactivo	Cantidad
Peptona	15 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5 g
Oxalato verde de Malaquita	2.5 mg
Agar	20 g
Agua destilada	1000 mL

### SOLUCIONES

#### Apéndice J. Acetato de Amonio

Reactivo	Cantidad
Acetato de amonio	583.5 g/1000 mL de Agua destilada
Acetato de amonio	58.35 g/100 mL de Agua destilada

#### Apéndice K. Ácido Etilendiaminotetracético (EDTA)

Reactivo	Cantidad
EDTA	18.4 g/100 mL de Agua destilada
EDTA	46.5 g/250 mL de Agua destilada

- Ajustar el pH a 8.0 con NaOH.

#### Apéndice L. Buffer de aislamiento

Reactivo	Cantidad
EDTA 0.5 M	30 mL
Tris	5 mL
Agua destilada	65 mL

#### Apéndice M. Cloroformo/Alcohol Isoamílico

Reactivo	Cantidad
Cloroformo	24 mL
Alcohol Isoamílico	1 mL

- Utilizado para remover proteínas de ácidos nucleicos, el cloroformo desnaturaliza proteínas, mientras el alcohol isoamílico reduce la formación de espuma durante la extracción y facilita la separación de la fase acuosa y orgánica.

#### Apéndice N. Fenol/Cloroformo 1:1

Reactivo	Cantidad
Fenol	10 mL
Cloroformo	10 mL

#### Apéndice Ñ. Polietilenglicol (PEG)

Reactivo	Cantidad
PEG	20 g
NaCl	14.61 g
Agua destilada	100 mL

### Apéndice O. Tris (Base)

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
Base Tris	121. 1 g
Agua destilada	800 mL
HCl	42 mL

### Apéndice P. Tris-EDTA Buffer (TE)

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
1M Tris pH: 8	1 mL
EDTA 0.5 M	200 $\mu$ L
Agua destilada	100 mL

### Apéndice Q. T1/10 E

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
Tris M pH: 8	1 mL
EDTA 0.5 $\mu$	20 $\mu$ L
Agua destilada	100