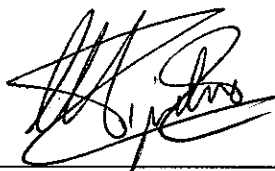


TESIS DEFENDIDA POR
Maria Dolores Camacho López
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ



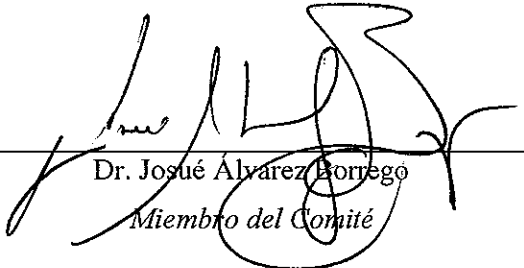
Dra. Rufina Hernández Martínez
Director del Comité



Dra. Meritxell Riquelme Pérez
Miembro del Comité



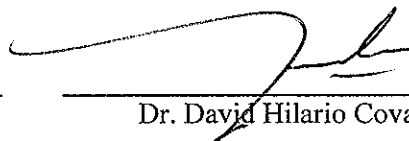
Dr. Cesar Valenzuela Solano
Miembro del Comité



Dr. Josué Álvarez Porrego
Miembro del Comité



Dra. Rufina Hernández Martínez
*Coordinador del programa de posgrado en
Ciencias de la Vida*



Dr. David Hilario Covarrubias Rosales
Director de Estudios de Posgrado

29 de mayo de 2012

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DE ENSENADA**



PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS DE LA VIDA

**Identificación y variabilidad genética de cepas de *Fusarium* spp.
aisladas de clavel (*Dianthus caryophyllus*) en Baja California, México**

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

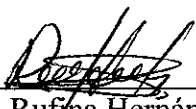
MARIA DOLORES CAMACHO LÓPEZ

Ensenada, Baja California, México, mayo 2012.

RESUMEN de la tesis de **MARIA DOLORES CAMACHO LÓPEZ**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS en CIENCIAS DE LA VIDA con orientación en MICROBIOLOGÍA. Ensenada, Baja California. Mayo 2012.

Identificación y variabilidad genética de cepas de *Fusarium* spp. aisladas de clavel (*Dianthus caryophyllus*) en Baja California, México

Resumen aprobado por:


Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de tesis

Algunas especies del género *Fusarium* son responsables de las enfermedades más devastadoras en el cultivo de clavel conocidas comúnmente como Marchitez o Fusariosis. En Baja California, aún no se tienen registros de las especies del género *Fusarium* asociadas a este cultivo, por lo que el objetivo de este estudio fue identificar morfológica y molecularmente cepas de *Fusarium* spp. aisladas de plantas de clavel con síntomas de marchitez vascular y pudrición del tallo. De plantas enfermas sintomáticas, se aislaron 64 cepas fúngicas. En base a su morfología, la pigmentación de la colonia y su tipo esporas en medio PDA (Potato Dextrose Agar por sus siglas en inglés), CLA (Carnation Leaf Agar por sus siglas en inglés) y SNA (Spezieller Nährstoffarmer Agar), se identificaron tres especies potencialmente patógenas: *Fusarium oxysporum*, *F. redolens* y *F. tricinctum*; y cuatro saprófitas: *F. proliferatum*, *F. solani*, *F. semitectum* y *F. globosum*. El análisis molecular usando la técnica de polimorfismos de la longitud de fragmentos de restricción del espaciador transcrito interno y el análisis de secuencias del factor de elongación de la traducción 1 α confirmó la identidad de *F. oxysporum*, *F. tricinctum*, *F. proliferatum*, *F. solani* y *F. semitectum*. La especie *F. oxysporum* fue la prevalente en todos los sitios de muestreo. En este trabajo, se reporta por primera vez la presencia de *F. tricinctum*, *F. solani* y *F. globosum* asociados a clavel en México.

Palabras Clave: Marchitez del clavel, fusariosis, microscopía, ITS-RFLP, EF1 α .

ABSTRACT of the thesis presented by MARIA DOLORES CAMACHO LÓPEZ as a partial requirement to obtain the MASTER OF SCIENCE degree in LIFE SCIENCES with orientation in MICROBIOLOGY. Ensenada, Baja California, México. May 2012.

Identification and genetic variability of strains of *Fusarium* spp. isolated from carnation (*Dianthus caryophyllus*) in Baja California, Mexico

Some species of the genus *Fusarium* are responsible for the most devastating diseases in carnation crops. These diseases are commonly known as wilt of carnation or fusariosis. In Baja California, so far there have been no records of *Fusarium* spp. associated with this crop. The aim of this study was the identification and analysis of the genetic diversity among *Fusarium* strains isolated from carnation plants with symptoms of wilting and vascular necrosis. Isolation from diseased plants allowed the recovery of sixty four strains. Based on their morphology, colony pigmentation and type of spores produced on PDA (Potato Dextrose Agar), CLA (Carnation Leaf Agar) and SNA (Spezieller Nährstoffarmer Agar) media, three potentially pathogenic species: *Fusarium oxysporum*, *F. redolens* and *F. tricinctum* were identified. In addition four saprophytic species were identified: *F. proliferatum*, *F. solani*, *F. semitectum* and *F. globosum*. Molecular analysis using restriction fragment length polymorphisms of the internal transcribed spacer region and sequence analysis of the translation elongation factor 1 α , confirmed the identity of *F. oxysporum*, *F. tricinctum*, *F. proliferatum*, *F. solani*, and *F. semitectum*. The species *F. oxysporum* was prevalent in all sampled sites. We reported for the first time the presence of *F. tricinctum*, *F. solani* and *F. globosum* associated with carnation in Mexico.

Keywords: Wilt of carnation, fusariosis, microscopy, ITS-RFLP, EF1 α .

Dedicatorias

A mi esposo e hijos
Piero ¡Te Amo!!
Diego (mi gran baterista)
Mariana (mi bello pajarito y la
mejor en el arte de la pintura)

A mis papás
Santiago y Ángela Teresita

A mis hermanos
Santiago, Miguel, Marco y Lila

A mis suegros
Mary y Román

¡Muchas gracias por todo su cariño y apoyo!

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada a lo largo de mis estudios de maestría.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) por todo el apoyo brindado durante todo este tiempo, así como también al Departamento de Microbiología. Gracias por darme esta gran oportunidad de formación académica y científica.

A los propietarios de los ranchos Twins, Pacifico, el Toro y la Rosalera. Muchas gracias por su amabilidad al haber permitido tomar muestras para que se llevara a cabo este trabajo.

A mi directora de Tesis, Dra. Rufina Hernández Martínez, muchas gracias por su gran apoyo en este trabajo, por sus enseñanzas y aportaciones, por confiar en mí y en mi trabajo. Ha logrado consolidar su propio laboratorio, lo cual es admirable. Además, ha propiciado un ambiente agradable de trabajo ¡Muchas Gracias!

A los miembros del comité, Dra. Meritxell Riquelme, Dr. Josué Álvarez y Dr. Cesar Valenzuela. Muchas gracias por todos sus comentarios y contribuciones para enriquecer y mejorar este trabajo.

Al Dr. Salomón Bartnicki y a las doctoras Rosa Mouriño, Ernestina Castro, Meritxell Riquelme y Rufina Hernández. Admiró y valoró mucho su trabajo, ustedes han conseguido que el departamento de Microbiología funcione y se esfuercen porque cada vez sea mejor. Me siento realmente orgullosa de pertenecer a este departamento. Muchas Gracias.

A Santiago Hardy, Mireya Rodríguez y Rocio Ayllon, quienes me ayudaron en la parte técnica de este trabajo. Muchas gracias además por brindarme su amistad y por los momentos tan agradables que pase con todos ustedes.

A mis compañeros y amigos, muchas gracias por los buenos momentos y experiencias compartidas. Lili, Abraham, Nancy, Paco, Rachel, Sara, Marcos y Cande, Muchas gracias porque siempre me han brindado su ayuda y de cada uno he aprendido grandes cosas académicas y personales. Además, aunque con algunos de ustedes he convivido más que con otros, siento un gran cariño y admiración por todos ustedes.

Al técnico del laboratorio Guillermo González, muchas gracias por tu apoyo y disponibilidad para ayudarme siempre que lo necesité.

Contenido

	Página
Resumen español.	i
Resumen inglés.	ii
Dedicatorias	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	v
Lista de figuras	ix
Lista de tablas	xii
 I. Introducción	 1
II. Antecedentes	4
1. Generalidades del cultivo de clavel.....	4
1.1. Origen	4
1.2. Descripción botánica de la planta.....	4
1.3. Breve historia de la producción de clavel con fines comerciales	4
1.4. Características generales de la producción.....	6
1.5. Importancia económica, zonas de producción y comercialización	6
1.6. Superficie y Estados productores de clavel en México	6
1.7. Producción de clavel en Baja California, México	7
1.8. Factores que afectan la producción y comercialización de clavel.....	7
2. Hongos del género <i>Fusarium</i>	7
2.1. Aspectos generales	7
2.2. Características de reproducción.....	8
2.3. Breve historia taxonómica.....	9
2.4. Sistema de clasificación de especies en base al concepto usado.....	11
2.5. Especies y subespecies del género <i>Fusarium</i>	12

Contenido (continuación)

	Página
2.6. Importancia de la distribución de especies en base al origen geográfico	13
3. Métodos de Identificación de <i>Fusarium</i> spp.	13
3.1. Identificación morfológica	13
3.1.1. Características morfológicas de la colonia	13
3.1.2. Macroconidios, microconidios y célula conidiogénica	14
3.2. Identificación molecular	16
3.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa	16
3.2.2. Polimorfismos de ADN	16
3.2.3. ADN ribosomal y Espaciador Transcrito Interno	17
3.2.4. Factor de elongación de la transcripción (EF1 α).....	18
3.2.5. Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción	19
4. Enfermedades en el cultivo de clavel ocasionadas por especies del género <i>Fusarium</i>.....	19
4.1 Marchitamiento vascular	20
4.1.1. <i>F. oxysporum</i> f. sp <i>dianthi</i>	20
4.1.2. Síntomas de la enfermedad.....	21
4.1.3. Ciclo de infección.....	22
4.2. Pudrición basal	23
4.2.1. <i>Fusarium graminearum</i>	24
4.2.2. <i>Fusarium avenaceum</i>	24
4.2.3. <i>Fusarium culmorum</i>	24
5. Especies del género <i>Fusarium</i> reportadas en el cultivo de clavel en México	24
III. Justificación.....	26
IV. Objetivos	27
V. Hipótesis	27
VI. Materiales y métodos	28
1. Colecta de muestras.....	28
2. Aislamiento y purificación de cepas.....	29

Contenido (continuación)

Página

3. Cultivos monospóricos	30
4. Preservación de cepas	30
5. Identificación morfológica	30
5.1 Características morfológicas evaluadas en PDA.....	30
5.2 Características morfológicas evaluadas en CLA y SNA	31
6. Identificación molecular	31
6.1. Extracción de ADN	31
6.2. Amplificación del espaciador transcrito interno (ITS1-5.8s-ITS2).....	32
6.3. Análisis por polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP)	32
6.4. Análisis del Factor de Elongación de la Traducción 1 α (EF1 α).....	33
6.6 Análisis de secuencias del EF1 α	34
VII. Resultados	35
1. Síntomas de marchitez en plantas de clavel.....	35
2. Cepas de <i>Fusarium</i> spp. aisladas de diferentes cultivares de clavel	36
3. Caracterización morfológica	38
3.1 Morfología de la colonia en medio PDA.....	38
3.2 Producción de esporodoquios y esclerocios	40
3.3. Características microscópicas analizadas en medio de cultivo CLA y SNA	43
3.3.1 Macroconidios	43
3.3.2. Microconidios.....	45
3.3.3. Células conidiogénicas	48
3.3.4. Clamidosporas	51
3.3.5. Formación de hifas estériles	52
4. Identificación de especies del género <i>Fusarium</i>.....	52
4.1 Especies del género <i>Fusarium</i> identificadas por sitio de muestreo.....	53
5. Caracterización molecular.....	59
5.1 Amplificación de la región ITS	59
5.2 Análisis RFLP	59
5.3. Análisis de secuencias del factor de elongación de la traducción EF1 α	64

Contenido (continuación)	Página
VIII. Discusión	71
IX. Conclusiones	80
X. Recomendaciones para trabajo a futuro	82
Literatura citada.....	83

Lista de figuras

	Página
Figura 1. Algunos ejemplos de cultivares comerciales de clavel (HilverdaKooij Plant Technology, catálogo 2009-2010).....	5
Figura 2. Representación esquemática del estado anamorfo del género <i>Fusarium</i> . a) esporodoquio, b) macroconidios, c) microconidios, d) clamidosporas, e) monofiálides y f) polifiálides (www.mycobank.org).	8
Figura 3. Representación esquemática del estado teleomorfo de <i>Fusarium</i> . a) peritecio, b) asca y c) ascosporas. (Trail et al., 2005; www.plantas y hongos.es).	9
Figura 4. Representación esquemática de las estructuras microscópicas de <i>Fusarium</i> . a-d) formas de macroconidios, b-l) forma basal y apical de macroconidios, m-t) formas de microconidios, u) monofiálides cortas, v) monofiálides largas, w-x) polifiálides, y) cadenas cortas de microconidios, z) cadenas largas de microconidios. (Esquema de Leslie et al., 2006).	15
Figura 5. Representación esquemática de los genes ribosomales y la región ITS (Internal transcribed spacer), las flechas pequeñas en dirección opuesta, representan la localización aproximada de los oligonucleótidos universales más utilizados en hongos (Adaptado de Abd-Elsalam et al., 2003).	18
Figura 6. Síntomas de marchitez vascular en plantas de clavel. a) síntomas externos, b y c) síntomas internos.	22
Figura 7. Síntomas característicos de marchitez encontrados en claveles de la zona muestreada. a) hojas secas color paja y tallo rosa-marrón, b) corte longitudinal del tallo mostrando síntomas de marchitez vascular, c) corte transversal a nivel de corona mostrando los haces vasculares y médula afectados, d) planta con apariencia de leña seca y raíz afectada por nemátodos.	35
Figura 8. Morfología y pigmentación de cepas del género <i>Fusarium</i> aisladas de clavel en medio PDA. a) FTO4T, b)FTW7T, c)FTW12C d)FRO13aT, e) FTO5aC, f)FTW8T, g) FRO8C, h) FTO11T, i)FRO9C, j) FTO1T, k) FRO13bT, l) FRO13cT.....	39

Lista de figuras (continuación)

Página

- Figura 9. Cepas de *Fusarium* spp. crecidas en PDA mostrando la producción de esporodoquios y esclerocios. a) FTW13C, b) FPA4bC, c) FPA4bT, d) FTO4C, e) FTO5aC y f) FTO5T. Flechas negras y blancas indican esporodoquios y esclerocios respectivamente. 40
- Figura 10. Esclerocios producidos por cepas de *Fusarium* spp. en medio PDA. a) FRO7C, b) FRO2bC y c) FRO10C..... 41
- Figura 11. Esporodoquios de *Fusarium* spp. producidos en medios PDA (a-e y g-h) y CLA (f , i). a) FPA4bC, b) FPA4bT, c) FRO3T, d) FRO9C, e y f) FPA2C, g) FPA1T, h e i) FTW11C..... 42
- Figura 12. Macroconidios de *Fusarium* spp. en medio CLA. a) FRO3T y b) FRO8C extraídos de esporodoquios, c) FPA4bC, d) FTW12C, e) FRO8C, f) FTW7T, g) FRO13bT, h) FRO6T, i) FTO4T, j) FTO11C. Barra de escala 10µm..... 45
- Figura 13. Microconidios del género *Fusarium* en medio SNA. a)FRO13bT, b) FTW12C, c) FRO13cT, d) FRO8C, e) FTW7T, f) FTO9C, g) FTO5aC, h) FTW13C. Barra de escala 10µm. 47
- Figura 14. Monofiálides y falsas cabezas producidas en medio SNA. Monofiálides cortas: a) FTO3C, b) FRO2bT, c) FTW6C. Monofiálides largas: d y e) FRO8C. Falsas cabezas: f) FTO5T, g) FTW6C, h) FRO8C. Barra de escala a-d y f-h) 10µm, d) 200 µm. 49
- Figura 15. Células conidiogénicas producidas en medio SNA. a-d) microconidios, e-f) macroconidios. a y b) FRO7C, c y d) FTW12C, e y f) FRO6T. Barra de escala 10µm. 50
- Figura 16. Polifiálides producidas en medio SNA. a) FPA1T, b) FTO1T, c) FTO9C. Escala 10µm. 51
- Figura 17. Clamidosporas en medio CLA. a, b, c)FPA2C, d y e) FTO5bC, f) FTW13C, g) FRO13bT. Barra de escala 10µm..... 52
- Figura 18. Hifas estériles producidas en medio SNA. a) FTW8T, b) FTW13T, c) FPA4aC, d) FTO11T, e) FRO1C, f) FRO11C. Barra de escala 10µm..... 53

Lista de figuras (continuación)

Página

- Figura 19. Ejemplo de un gel de agarosa (2.5%) mostrando fragmentos de la región ITS (ITS1-5.8S-ITS2) amplificados por PCR con los oligonucleótidos ITS1 e ITS4. 1) FRO1C, 2) FRO2aC, 3) FRO2bC, 4) FRO3C, 5) FRO4C, 6) FRO5C, 7) FRO6C, 8) FRO7C, 9) FRO8C, 10) FRO9C, 11) FRO10C, 12) FRO11C, 13) FRO12C, 14) FRO13bC, 15) FRO13cC, 16) FRO14C, 17) FRO1T, 18) FRO2aT, 19) FRO2bT. M= marcador de peso molecular (100 pb, Labnet International, Inc.). 59
- Figura 20. Gel de Agarosa mostrando la restricción de la región ITS con las endonucleasas *MspI* y *SmaI* de cepas identificadas morfológicamente como *F. redolens*: 1) FTW5C, 2) FTW6C, 3) FTW10C, 4) FTW13C, 6) FTO2C, 7) FTO3C, 8) FTO5aC, 13) FRO2bC, 16) FRO10C, 21) FPA2T, 23) FPA4aT, 24) FPA4bT 27) FTO5T; *F. oxysporum*: 5) FPA3C, 9) FTO6C, 10) FTO7C, 11) FTO9C, 12) FTO11C, 14) FRO3C, 15) FRO6C, 17) FRO11C, 18) FRO12C, 19) FRO14C, 20) FRO2aT, 22) FPA3T, 25) FTO3T, 26) FTO4T, 28) FTO7T, 29) FTO8T, 30) FRO2bT, 31) FRO7T, 32) FRO8T, 33) FRO9T, 34) FRO10T M= marcador de peso molecular (100 pb, Labnet International, Inc.). 61
- Figura 21. Análisis de restricción de la región ITS con las endonucleasas *MspI* y *SmaI* de cepas identificadas morfológicamente como *Fusarium solani*: (carriles 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 y 9, cepas FPA2C, FPA4aC, FRO1C, FRO2aC, FRO5C, FRO8C, FRO9C y FRO1T respectivamente); *Fusarium proliferatum*: (carriles: 5, 10, 14, 15, 17, 19, 20 y 21, cepas FRO4C, FRO4T, FTO1C, FTO4C, FRO7C, FTW7T, FTW8T y FTW13T respectivamente); *F. globosum*: (carril 12, cepa FTW12C); *F. tricinctum* (carriles 11 y 18 cepas FRO13cT y FRO13cC respectivamente); *Fusarium* sp. (carriles 16, 22 y 23, cepas FTO9C, FPA1T y FTO1T respectivamente); *F. oxysporum* (carril 13, cepa FPA4bC) . M= marcador de peso molecular (100 pb, Labnet International, Inc.). 63
- Figura 22. Restricción de la región ITS con *MspI* y *SmaI*, de cepas identificadas morfológicamente como *F. semitectum*. 1) FTW11, 2) FTO5bC, 3) FRO13bC, 4) FTO11T, 5) FRO3T, 6) FRO6T, 7) FRO13bT. M= marcador de peso molecular (100 pb, Labnet International, Inc.). 64

Lista de tablas

	Página
Tabla I. Subespecies de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i> , descritas por Garibaldi (Andrés et al., 2001).	20
Tabla II. Ubicación de los sitios de muestreo y cultivares de clavel bajo estudio.	28
Tabla III. Enzimas utilizadas para un análisis de restricción en la región ITS de <i>Fusarium</i> spp.	33
Tabla IV. Relación de cepas obtenidas por sitio de muestreo, tejido de la planta y cultivar muestreado.	37
Tabla V. Diferencias morfológicas de macroconidios producidos en CLA por diferentes cepas.	44
Tabla VI. Características morfológicas de cepas de <i>Fusarium</i> spp. aisladas de plantas de clavel.	54
Tabla VII. Cepas de <i>Fusarium</i> spp. identificadas bajo el concepto de especie morfológica, correspondientes al rancho Twins.	55
Tabla VIII. Cepas de <i>Fusarium</i> spp. identificadas bajo el concepto de especie morfológica, correspondientes al rancho Pacífico.	56
Tabla IX. Cepas de <i>Fusarium</i> spp. identificadas bajo el concepto de especie morfológica, correspondientes al rancho El Toro.	57
Tabla X. Cepas de <i>Fusarium</i> spp. identificadas bajo el concepto de especie morfológica, correspondientes al rancho La Rosalera.	58
Tabla XI. Fragmentos de restricción obtenidos de la región ITS1-5.8S-ITS2 de cepas de <i>Fusarium</i> spp.	60
Tabla XII. Comparación de secuencias de <i>Fusarium</i> spp. obtenidas en este estudio con secuencias documentadas en el NCBI, correspondientes al gen del factor de elongación de la traducción 1 α	66
Tabla XIII. Comparación de secuencias de <i>Fusarium</i> spp. obtenidas en este estudio con secuencias documentadas en el NCBI, correspondientes al gen del factor de elongación de la traducción 1 α (Continuación).	67

Lista de tablas (continuación)

Página

Tabla XIV. Comparación de secuencias de <i>Fusarium</i> spp. obtenidas en este estudio con secuencias documentadas en el NCBI, correspondientes al gen del factor de elongación de la traducción 1 α .(Continuación).....	68
Tabla XV. Comparación de secuencias de <i>Fusarium</i> spp. obtenidas en este estudio con secuencias documentadas en el NCBI, correspondientes al gen del factor de elongación de la traducción 1 α .(Continuación).....	69
Tabla XVI. Especies del género <i>Fusarium</i> identificadas bajo el concepto morfológico.....	70
Tabla XVII. Especies del género <i>Fusarium</i> identificadas bajo el concepto filogenético.	70

I. Introducción

El clavel es la tercera especie ornamental más importante a nivel mundial después de la rosa y el crisantemo. En los últimos años, el Estado de Baja California, México, ha incrementado su participación en la floricultura y se ha convertido en uno de los principales Estados exportadores hacia Estados Unidos, uno de los principales países consumidores de flores a nivel mundial (Luque Félix y Osuna Millán, 2006). Dentro de los factores que limitan la producción, y por lo tanto la exportación de clavel, se encuentran las enfermedades causadas por hongos. Alrededor del mundo, se ha reportado a los miembros del género *Fusarium* como los responsables de las enfermedades más importantes en el cultivo, ocasionando las enfermedades conocidas comúnmente como marchitez vascular y pudrición del tallo (Kalc Wright et al., 1997; García García y Camargo Ricalde, 2006). El agente causal de la marchitez vascular es la especie hospedero-específica *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*. De esta especie se conocen once razas patogénicas, las cuales son cultivar-específicas. La raza 2 tiene distribución cosmopolita, el resto se han reportado sólo en algunos países (Chiocchetti et al., 1999). Por otro lado, aunque la etiología de la enfermedad de pudrición del tallo no está claramente definida, se ha asociado con la presencia de las especies *F. avenaceum*, *F. culmorum* y *F. graminearum*, y aunque cuenta con menos reportes que la anterior, se considera una enfermedad importante en el cultivo.

Históricamente la identificación de especies en el género *Fusarium* ha sido muy confusa, por los diversos sistemas de clasificación que han surgido a lo largo del tiempo. Con el propósito fundamental de mejorar las estrategias de control de las enfermedades, se han desarrollado varios métodos para la identificación de las especies del género *Fusarium*. Existen tres conceptos bajo los cuales se puede definir una especie: morfológico, biológico y filogenético. El concepto morfológico, delimita una especie con base en la similitud o diferencia de las estructuras de reproducción asexual del hongo. Sin embargo, existen cepas o especies morfológicamente indistinguibles, que se han logrado identificar sólo mediante el concepto filogenético, el cual define una especie, como un grupo de organismos que

descienden de un ancestro común, es decir, que tienen origen monofilético. Este último tipo se basa en la utilización de diversas técnicas de biología molecular, basadas principalmente en el análisis de secuencias del ADN. El concepto biológico que fue desarrollado antes del análisis filogenético moderno, acentúa el intercambio de genes (es decir, reproducción sexual y parasexual) dentro de la especie y la presencia de las barreras que previenen el cruce de la especie (Davis, 1995). Sin embargo, este concepto es difícil de aplicar porque el tipo de reproducción sexual es el menos común en hongos.

En el estado de Baja California, aún no se han identificado las especies del género *Fusarium* presentes en el cultivo de clavel. Por lo que, el objetivo del presente estudio fue aislar e identificar morfológica y molecularmente las especies del género *Fusarium* asociadas a diferentes cultivares de clavel producidos en la zona florícola de Baja California, con síntomas de marchitez. La hipótesis de este trabajo es que se encontrarán especies del género *Fusarium* potencialmente patógenas y saprófitas asociadas a estos cultivares. Para lograr los objetivos y probar esta hipótesis, se realizó un muestreo en cuatro sitios de producción, dos de ellos ubicados en el Municipio de Ensenada y dos en Playas de Rosarito. Se tomaron muestras de diferentes cultivares y se aislaron los hongos de la corona y tallo de las plantas.

Para identificar morfológicamente las cepas aisladas a nivel de especie, se realizó un análisis comparativo apoyado en el manual de laboratorio de *Fusarium* (Leslie et al., 2006) y se analizaron características tales como la apariencia y pigmentación de la colonia, la producción de esporodoquios y esclerocios, la forma, tamaño y presencia de macroconidios, microconidios, clamidosporas y tipo de célula conidiogénica. Además, se utilizaron dos técnicas de identificación molecular, la primera fue un análisis de Polimorfismos de la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP) y la segunda fue un análisis de secuencias de un fragmento del factor de elongación de la traducción 1 α (EF1 α).

Con este trabajo se pretende conocer el panorama general de las especies potencialmente patógenas y saprófitas presentes en los diversos cultivares de clavel producidos en la zona

florícola de Baja California. En estudios posteriores se podría investigar la función que cumplen cada una de las especies identificadas en el cultivo del clavel. Ahora bien, en caso de que *F. oxysporum*, fuera encontrado en las muestras analizadas, posteriormente se podrían identificar a nivel subespecífico las razas presentes en la zona, lo cual contribuiría a mejorar las estrategias de control de las enfermedades que dañan al cultivo del clavel.

II. Antecedentes

1. Generalidades del cultivo de clavel

1.1. Origen

El clavel es una planta ornamental de origen mediterráneo, pertenece a la familia Caryophyllaceae y al género *Dianthus*. La especie *Dianthus caryophyllus* L. es la que se produce comercialmente como flor de corte y la que tiene gran demanda internacional (Infoagro, 2010).

1.2. Descripción botánica de la planta

La familia Caryophyllaceae incluye plantas que presentan nudos en los tallos, hojas opuestas, enteras y angostas, flores hermafroditas y fruto capsular. Un tallo común de clavel consta de 15 a 18 nudos y cada nudo posee brotes laterales, pero sólo a partir del sexto nudo, los brotes producen flores; por debajo de estos, los brotes son vegetativos (Afanador Pérez, 2005)

1.3. Breve historia de la producción de clavel con fines comerciales

El interés comercial por esta especie data del siglo XVI, época en la que se realizaron los primeros mejoramientos. Los claveles de floración permanente se desarrollaron en Francia en 1840 y se introdujeron a América en 1852. En el siglo XIX mediante el mejoramiento y cruces de claveles franceses, italianos y españoles se obtuvieron los claveles Niza. En 1938, William Sim, un norteamericano de Maine, llevó a Estados Unidos algunas variedades de clavel de Niza, realizó mejoramiento y creó híbridos algo distintos a los europeos, los cuales recibieron el nombre de clavel Sim o americano. Este tipo de clavel suele ser de mayor longitud y de cáliz más firme, pero presenta mayor susceptibilidad a enfermedades y es difícil de cultivar a la intemperie (Afanador Pérez, 2005).

López (1989) clasificó el clavel utilizado en la floricultura en tres tipos: a) Europeos, b) Americanos (Sim) y c) Miniclaveles (spray). Los más fáciles de cultivar son los europeos; éstos pueden producirse a la intemperie por lo que no requieren de gran tecnología. El clavel Sim es el mejor pagado, pero se requiere de invernaderos para su producción y el miniclavel tiene mayor demanda en Europa y también requiere de alta tecnología para su producción (Afanador Pérez, 2005). Tras una multitud de hibridaciones y procesos de selección actualmente existen una gran cantidad de cultivares comerciales de clavel (Figura 1), que se diferencian por sus características tales como, el color, la forma y textura de la flor, la adaptabilidad de las plantas a la intemperie o invernadero, su rendimiento y resistencia o susceptibilidad a enfermedades. De acuerdo con estas características y la demanda en el mercado es como se seleccionan los cultivares para su producción (Afanador Pérez, 2005).



Figura 1. Algunos ejemplos de cultivares comerciales de clavel (HilverdaKooij Plant Technology, catálogo 2009-2010).

1.4. Características generales de la producción

El clavel es una planta perenne de base leñosa, tolerante a suelos salinos. Se reproduce principalmente a través de esquejes. Se estima que su ciclo de vida es de dos años aproximadamente. Afanador Pérez (2005) menciona que en Colombia, la producción de flores inicia a partir del sexto mes de la plantación, aunque esto depende de cada cultivar. En este mismo país, se calcula que la productividad promedio de clavel estándar es entre 180-210 flores/m²/año, mientras que el clavel miniatura tiene una productividad de 190 flores/m²/año; sin embargo, estos datos pueden variar por la influencia de los factores ambientales y el manejo del cultivo (Afanador Pérez, 2005).

1.5. Importancia económica, zonas de producción y comercialización

A nivel mundial el clavel es uno de los cultivos ornamentales más importantes, después de la rosa y el crisantemo (Afanador Pérez, 2005). Se comercializa de dos maneras principales: flor de corte y esquejes. En Europa, Holanda es el principal comercializador y distribuidor de flores de corte, y el primer productor y exportador de esquejes a nivel mundial. En América, Estados Unidos es uno de los principales países consumidores y Colombia es el principal productor y proveedor (Soto Sedano et al., 2009). Otros países en donde se produce con gran importancia económica son: Australia, España, Italia, Israel, Venezuela, Argentina, Corea y México, entre otros (Kalc Wright et al., 1997; Andrés et al., 2001; Chiocchetti et al., 1999; Suk Han et al., 2001; Trujillo et al., 2005; Martínez Fernández, 2008).

1.6. Superficie y Estados productores de clavel en México

El cultivo de clavel en México, ocupa el 4% de la superficie total dedicada a la producción de plantas ornamentales (Garcés de Granada et al., 2001). La producción nacional es de 467 ha, lo cual tiene un valor de 329,676.32 mil pesos (SIAP, 2010). El Estado de México es el principal productor, aunque también se cultiva en Puebla, Michoacán, Morelos, el Distrito Federal y Baja California (García García y Camargo Ricalde, 2006).

1.7. Producción de clavel en Baja California, México

En los últimos años, el Estado de Baja California ha incrementado su participación en la floricultura y se ha convertido en uno de los principales exportadores nacionales de clavel hacia Estados Unidos. Además de proveer el mercado local, Baja California, compite en calidad y precio con los productores de China y Centro América (principalmente Honduras y Costa Rica). Los municipios de Ensenada y Playas de Rosarito son los que concentran la mayor producción del Estado (Luque Félix y Osuna Millán, 2006).

1.8. Factores que afectan la producción y comercialización de clavel

Además de los factores abióticos, el principal factor limitante en la producción de clavel en México y a nivel mundial, son las enfermedades ocasionadas por hongos, particularmente los del género *Fusarium*. Este hongo causa las enfermedades más devastadoras en el cultivo, conocidas comúnmente como marchitez vascular o pudrición del tallo (Kalc Wright et al., 1997; García García y Camargo Ricalde, 2006).

2. Hongos del género *Fusarium*

2.1. Aspectos generales

Los miembros de este género pertenecen a un grupo cosmopolita de hongos, que se encuentran ampliamente distribuidos en el suelo y son capaces de colonizar la parte aérea y subterránea de las plantas, así como restos vegetales y otros sustratos orgánicos (Summerell et al., 2003). *Fusarium* es considerado como uno de los géneros de hongos fitopatógenos más importantes ya que causa enfermedades en cultivos de gran importancia económica; aunque también puede vivir de manera saprófita sobre residuos de estos cultivos. Las especies patógenas de este género pueden causar marchitamientos, podredumbres de raíz y canchros en una amplia variedad de cultivos. Algunas especies producen micotoxinas, que son metabolitos secundarios capaces de provocar enfermedades severas en animales y humanos que ingieren productos contaminados con ellas (Marín García, 2010).

2.2. Características de reproducción

El género *Fusarium* es un grupo de hongos filamentosos que pueden reproducirse de forma sexual (teleomorfo) o asexual (anamorfo). La forma de reproducción asexual es la más común y se caracteriza porque puede producir tres tipos de conidios (esporas asexuales): macroconidios, microconidios y clamidosporas. Los macroconidios, son las esporas más representativas del género por su forma de “canao” o “media luna” y se forman generalmente en esporodoquios, los cuales son cuerpos fructíferos asexuales en forma de almohada formados por conidióforos cortos donde nacen éstas esporas. Los microconidios nacen de células conidiogénicas denominadas fiálides y las clamidosporas se forman directamente a partir del micelio y en algunos casos a partir de esporas (Figura 2) (Leslie et al., 2006).

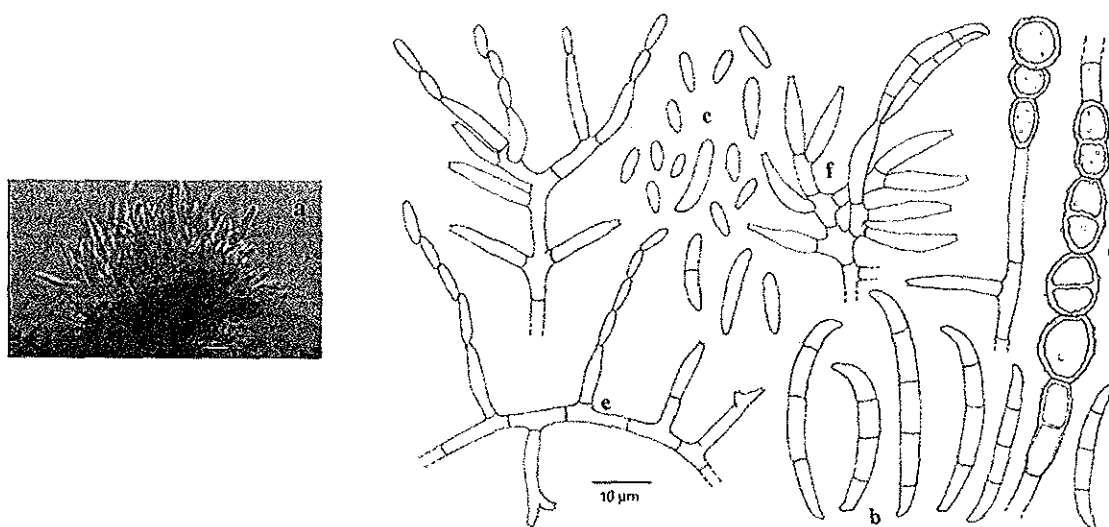


Figura 2. Representación esquemática del estado anamorfo del género *Fusarium*. a) esporodoquio, b) macroconidios, c) microconidios, d) clamidosporas, e) monofiálides y f) polifiálides (www.mycobank.org).

La forma de reproducción sexual es menos común, sólo en algunas especies se ha logrado observar bajo condiciones de campo y/o en laboratorio. En este tipo de reproducción, las ascosporas (esporas sexuales) están contenidas en ascas dentro de un cuerpo fructífero denominado peritecio (Figura 3). De acuerdo con la formación de estas estructuras y otras características, las especies teleomórficas de *Fusarium* se han agrupado en tres géneros

principales: *Gibberella*, *Haematonectria* y *Albonectria*. De manera que las especies se clasifican distintamente, cuando se conocen ambos estados sexuales, por ejemplo: *Haemanectria haematococca* es el teleomorfo de *Fusarium solani*, de igual manera, *Gibberella zeae* es el teleomorfo de *F. graminearum* y *Albonectria rigidiuscula* es el teleomorfo de *F. decemcellulare* (Leslie et al., 2006).

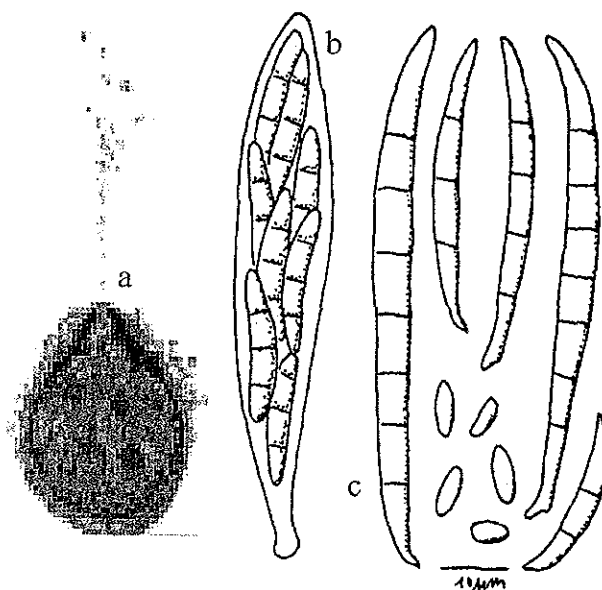


Figura 3. Representación esquemática del estado teleomorfo de *Fusarium*. a) peritecio, b) asca y c) ascosporas. (Trail et al., 2005; www.plantas y hongos.es).

2.3. Breve historia taxonómica

El género *Fusarium* fue descrito por primera vez en 1809 por Link, distinguiendo como carácter primario la forma de “canao” o “media luna” de los macroconidios. Sin embargo, Seifert en 1935 señaló que la forma de las esporas no es un carácter distintivo único de este género, pues un gran número de coelomycetes producen esporas que podrían ser fácilmente confundidas con las del género *Fusarium*, si éste fuera el único criterio de identificación (Leslie et al., 2006).

Continuando con el trabajo realizado por Link (1809), muchas de las primeras investigaciones estuvieron enfocadas al diagnóstico, identificación y clasificación de especies del género *Fusarium* que producen enfermedades en las plantas. Cada aislamiento de una especie de planta representaba una especie del género *Fusarium* hospedero-específica, así que, en un período relativamente corto de tiempo se describieron más de mil especies, lo cual condujo a un estado de confusión, hasta mediados de 1930, que fue cuando Wollenweber y Reinking (1930) reformularon el concepto de especie (Leslie et al., 2006).

El trabajo de Wollenweber y Reinking (1930), es considerado como uno de los más importantes, pues sirvió de base para desarrollar un sistema taxonómico moderno. Ellos propusieron un sistema basado en 16 secciones, 65 especies y 77 variedades y formas subespecíficas. Muchas de estas especies y secciones continúan en uso. Cada sección contiene relativamente pocas especies, unidas por caracteres morfológicos críticos, por ejemplo, la morfología de los macroconidios y la pigmentación de las colonias. Así, la identificación se redujo a un proceso de dos pasos: primero identificar la sección y después dentro de la sección, identificar la especie (Leslie et al., 2006).

Posteriormente, otro de los trabajos relevantes fue el de Snyder y Hansen (1940-1950), en el cual se redujo a nueve el número de especies. Muchas de ellas tenían un origen polifilético, por lo que este sistema taxonómico terminó siendo inadecuado. Únicamente las especies *F. oxysporum* y *F. solani* propuestas por estos taxónomos continúan siendo ampliamente usadas (Leslie et al., 2006).

El sistema taxonómico desarrollado por Booth (1960-1970) también contribuyó mucho a la taxonomía moderna. Además de publicar una monografía que incluye claves para la identificación de secciones y especies del género *Fusarium*, este taxónomo, introdujo el uso de la morfología de la célula conidiogénica, como un carácter de diagnóstico a nivel de especie (fundamentalmente aquella que produce microconidios). La morfología de la célula

conidiogénica ahora es esencial para distinguir algunas especies en las secciones *Liseola* y *Sporotrichiella* (Leslie et al., 2006).

Gerlach y Nirenberg (1982), así como, Nelson y colaboradores (1983), publicaron por separado un Manual para la identificación de especies del género *Fusarium*. Ambos grupos entrelazaron los trabajos anteriores de Wollenweber y Reinking, Snyder y Hansen, y Booth, en un sistema taxonómico con definiciones de especie razonablemente robustas, basado exclusivamente en caracteres morfológicos. Aunque cada grupo creó su propio sistema taxonómico, éstos tienen más cosas en común que diferencias y ambos usan las secciones y definiciones de especie propuestas por Wollenweber y Reinking (1930). La mayoría de las investigaciones recientes sobre *Fusarium* usan porciones de ambos sistemas como base para identificar especies y describir nuevos taxones (Leslie et al., 2006).

Actualmente el género *Fusarium* se clasifica de la siguiente manera:

Phylum:	Ascomycota
Subphylum:	Pezizomycotina
Clase:	Sordariomycetes
Orden:	Hipocreales
Familia:	Nectriaceae
Género:	<i>Fusarium</i>
Especie:	<i>F. oxysporum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. solani</i> , <i>F. avenaceum</i> , <i>F. proliferatum</i> .

Fuente: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy>

2.4. Sistema de clasificación de especies en base al concepto usado

Las especies de hongos suelen clasificarse bajo tres conceptos: morfológico, biológico y filogenético. Históricamente, el concepto morfológico es el más usado, y se basa

principalmente en las diferencias morfológicas haciendo énfasis en las estructuras de reproducción. El concepto biológico, se enfoca al tipo de reproducción sexual, sin embargo, es de difícil aplicación porque este tipo de reproducción es el menos común dentro de los hongos. El concepto filogenético, hace referencia a las características moleculares de los organismos, principalmente al análisis de secuencias de ADN mediante diversas técnicas de biología molecular. Estos conceptos, principalmente el morfológico y filogenético, en muchos casos se contraponen. El concepto tradicional, insiste en que todos los organismos deben estar relacionados filogenéticamente, sin embargo, no todos ellos son morfológicamente iguales. Cualquier sistema utilizado es válido, pero se debe dejar claro el concepto bajo el cual se identifica una especie (Montes et al., 2003)

2.5. Especies y subespecies del género *Fusarium*

En promedio, existen alrededor de 70 especies del género *Fusarium* identificadas bajo el concepto morfológico (Leslie et al., 2006). Dentro ellas, están contenidas especies tanto patógenas como saprófitas. Las especies patógenas pueden tener un limitado o amplio rango de hospederos. Dentro de algunas especies que presentan un amplio rango de hospederos, se han identificado subespecies, con características morfológicamente indistinguibles, pero con la capacidad de causar daño en un sólo hospedero o un rango muy reducido de hospederos, las cuales se denominan “formas especiales” (f. sp.) por ser “hospedero específicas”. Así, por ejemplo *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, *F. oxysporum* f. sp. *cubense* y *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* sólo causan enfermedades en algodón, banano y clavel respectivamente (Baayen et al., 2001; Summerell et al., 2003). Así mismo, dentro de una misma “forma especial” han surgido cepas “cultivar específicas” a las que se les denomina “razas fisiológicas” por causar daño en un sólo cultivar de la planta hospedera. Cuando las razas fisiológicas tienen la capacidad de anastomarse (unir sus hifas y producir plasmogamia que es la unión de contenido citoplasmático) y formar un heterocarión estable, se dice que pertenecen al mismo Grupo de Compatibilidad Vegetativa (VCG por sus siglas en inglés), que es otra forma de clasificarlas (Summerell et al., 2003, Lievens et al., 2008).

2.6. Importancia de la distribución de especies en base al origen geográfico

El origen geográfico de las especies del género *Fusarium* está relacionado principalmente con el clima presente en un área determinada. Las variaciones en el clima, incluso a nivel local, pueden influir en el rango de especies observadas o que pueden ser recuperadas tanto de ecosistemas naturales como agrícolas. Por ejemplo, la pudrición del tallo de maíz en áreas relativamente cálidas y secas es causado por *F. verticillioides*, mientras que la misma enfermedad en áreas húmedas y frías es causada por *F. subglutinans*. En algunos casos estas diferencias han sido útiles para desarrollar sistemas de predicción de enfermedades ocasionadas por este patógeno. En general, existen cuatro tipos de distribución de especies en base al clima que prefieren: tropical, cálido-árido, templado y un cuarto grupo que tiene distribución cosmopolita (Summerell et al., 2003).

3. Métodos de Identificación de *Fusarium* spp.

3.1. Identificación morfológica

Uno de los métodos tradicionales para la identificación de especies del género *Fusarium* está basado en las características morfológicas del hongo. Leslie et al. (2006) recomiendan el uso de tres medios de cultivo para llevar a cabo el proceso de identificación: PDA (Potato Dextrose Agar por sus siglas en inglés), para analizar la morfología de la colonia; CLA (Carnation Leaf Agar por sus siglas en inglés) y SNA (Spezieller Nährstoffarmer Agar) para el análisis de las estructuras microscópicas.

3.1.1. Características morfológicas de la colonia

Las características específicas que se analizan en medio de cultivo PDA son las siguientes: a) apariencia de la colonia: micelio plano, algodonoso o flocooso. b) pigmentación: diversas tonalidades en el adverso y reverso en colores rosa, púrpura, amarillo, marrón, rojo, etc., c) presencia o ausencia de esporodoquios y esclerocios, así como su abundancia y tonalidades (Leslie et al., 2006).

3.1.2. Macroconidios, microconidios y célula conidiogénica

Los macroconidios, son las esporas más representativas del género por su forma de “canoa” o “media luna”, se producen generalmente en esporodocios. Es recomendable examinar los macroconidios que se producen en estas estructuras formadas en medio de cultivo CLA, porque son más consistentes en términos de tamaño y forma (Fisher et al., 1982). Las características que se examinan son la forma, el tamaño, el número de septos (Figuras 4a-4d) y la forma de la célula basal y apical (Figuras 4e-4l).

Los microconidios sólo se producen por algunas especies del género *Fusarium*, por lo cual, la presencia o ausencia de éstos es un carácter importante de identificación. Cuando están presentes, se examinan las siguientes tres características. a) forma: las más comunes son las de tipo oval, doble célula oval, triple célula oval, reniforme, ovoide con la base truncada, piriforme, napiforme y globosa (Figuras 4m-4t). b) tamaño: al igual que en los macroconidios el tamaño en realidad es cualitativo más que cuantitativo, algunas especies producen mesoconidios, este tipo de esporas tienen un tamaño intermedio entre macro y microconidios. c) número de septos: usualmente estas esporas presentan cero o un septo, pero algunas especies pueden presentar dos o más septos.

La célula de donde nacen los conidios llamada fiálide, suele presentar dos tipos básicos: monofiálides y polifiálides. La diferencia entre ellas es el número de aberturas por célula. Las monofiálides tienen una sola abertura (Figuras 4u y 4v), mientras que las polifiálides tienen más de una (Figuras 4w y 4x). Estas estructuras se diferencian también por su tamaño, forma y la manera en cómo se disponen los conidios sobre éstas, ya sea en falsas cabezas (Figura 4v), cadenas cortas (Figura 4y) o cadenas largas (Figura 4z) (Leslie et al., 2006).

Las clamidosporas son también un carácter importante en la descripción de muchas especies. Estas son un tipo de esporas, también conocidas como estructuras de resistencia, porque suelen sobrevivir bajo condiciones adversas. Estas esporas pueden producirse de forma individual, en pares, en cadenas cortas o en grupos. Su formación puede tardar entre

dos y seis semanas. Se producen de forma terminal o intercalar en el micelio o a partir de conidios; pueden ser lisas o rugosas, hialinas o pigmentadas. Algunas especies producen pseudoclamidosporas o burbujas en las hifas, las cuales pueden ser confundidas con clamidosporas pero son distintas a éstas, en tales casos estas estructuras suelen ser un carácter primario de identificación (Leslie et al., 2006).

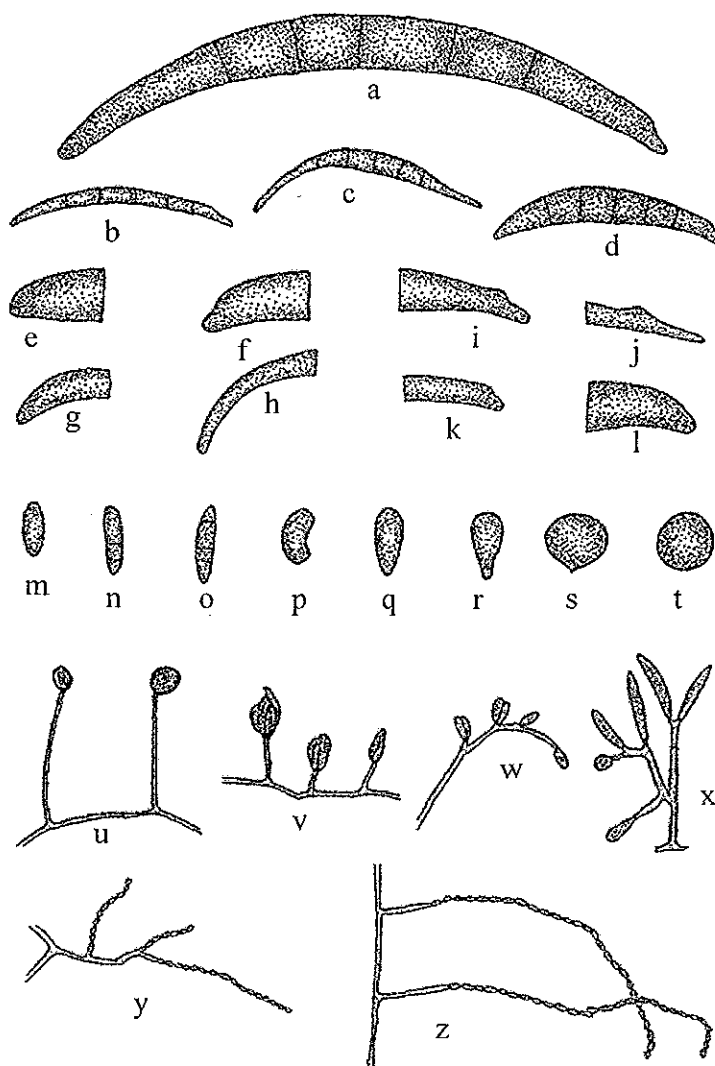


Figura 4. Representación esquemática de las estructuras microscópicas de *Fusarium*. a-d) formas de macroconidios, b-l) forma basal y apical de macroconidios, m-t) formas de microconidios, u) monofilides cortas, v) monofilides largas, w-x) polifilides, y) cadenas cortas de microconidios, z) cadenas largas de microconidios. (Esquema de Leslie et al., 2006).

3.2. Identificación molecular

Las técnicas de biología molecular han tenido gran impacto en cuanto a la rapidez y confiabilidad en la identificación de especies de hongos con fines taxonómicos o filogenéticos. Se han establecido diversos métodos basados en el ADN para detectar e identificar especies del género *Fusarium*, algunos de estos métodos son: reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés de “Polymerase Chain Reaction”), secuenciación de regiones conservadas para realizar un análisis filogenético y polimorfismos de la longitud de fragmentos de restricción (RFLP por sus siglas en inglés “Restriction Fragment Length Polymorphisms”) (Nitschke et al., 2009).

3.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa

La mayoría de las técnicas de biología molecular usan como herramienta básica la reacción en cadena de la polimerasa. La PCR es un método *in vitro* que permite amplificar secuencias específicas de ADN, generando millones o billones de copias exactas, incluso con cantidades traza de ADN de alguna muestra. Los elementos básicos para llevar a cabo esta reacción son: el ADN templado, dos oligonucleótidos que delimitan el fragmento deseado, la enzima que genera los fragmentos (ADN polimerasa), nucleótidos (dNTPs) y un amortiguador de amplificación. El proceso de reacción consta de tres pasos principales: a) desnaturalización b) alineamiento y c) extensión; los cuales se llevan a cabo en un aparato denominado termociclador, que permite programar de forma automática variaciones de altas y bajas temperaturas, durante varios ciclos hasta completar dicho proceso (Moore y Novak, 2002; Cortazar Martínez y Silva Rincón, 2004).

3.2.2. Polimorfismos de ADN

Las diferencias en la secuencia de ADN son llamadas polimorfismos de ADN, estas diferencias surgen mediante transiciones, transversiones, deleciones, inserciones o errores en la replicación de esta molécula. Los polimorfismos proporcionan las bases para el análisis físico directo del genotipo usando métodos moleculares. Algunos polimorfismos se

presentan dentro de genes funcionales, sin embargo, en promedio, alrededor del 30% del ADN nuclear de los hongos comprende secuencias no codificantes (por ejemplo: espaciadores, intrones y varios tipos de secuencias repetidas). Las variaciones en algunas de estas regiones son potencialmente detectables como polimorfismos. Los polimorfismos más simples son cambios en una sola base. Estos también son los más numerosos; el 95% de ellos son de este tipo (Moore y Novak, 2002).

3.2.3. ADN ribosomal y Espaciador Transcrito Interno

El ADN ribosomal (rADN) es utilizado para analizar filogenéticamente grupos estrechamente relacionados a nivel de género, especie o entre aislamientos de una sola especie de hongos, debido a que entre las regiones altamente conservadas se encuentran regiones que evolucionan rápidamente. El rADN, contiene la información para el ARN que conforma los ribosomas, por lo que es información que se transcribe pero no se traduce. El rADN usualmente contiene desde 50 hasta varios cientos de copias repetidas en tándem de una unidad de transcripción formada por tres subunidades altamente conservadas 18S-5.8S-28S, mas varios espaciadores adyacentes no transcritos. El número de copias puede variar según el organismo. Dentro de una unidad de transcripción, las subunidades altamente conservadas están separadas mediante los espaciadores transcritos internos (ITS por sus siglas en inglés “Internal Transcribed Spacer”) ITS1 e ITS2, los cuales contienen secuencias de ADN que no codifican, y aunque son parte de la unidad transcriptora ribosomal, son eliminados después de la transcripción, por lo que estas secuencias no se incorporan en los ribosomas maduros (Figura 5). Las secuencias de nucleótidos de la región ITS, son altamente variables; el polimorfismo las hace candidatos ideales, como marcadores moleculares que varían lo suficientemente rápido para realizar estudios taxonómicos principalmente a nivel interespecífico (Moore y Novak, 2002). La región ITS completa tiene un tamaño aproximado de 700 pares de bases (pb), sin embargo, este tamaño puede variar en base al número de secuencias repetidas internamente. Debido a la corta longitud y la naturaleza de los genes ribosomales de la subunidad que flanquean la región ITS, ésta es amplificada fácilmente por PCR, además de que existen

oligonucleótidos universales que amplifican esta región (White et al., 1990; Moore y Novak, 2002).

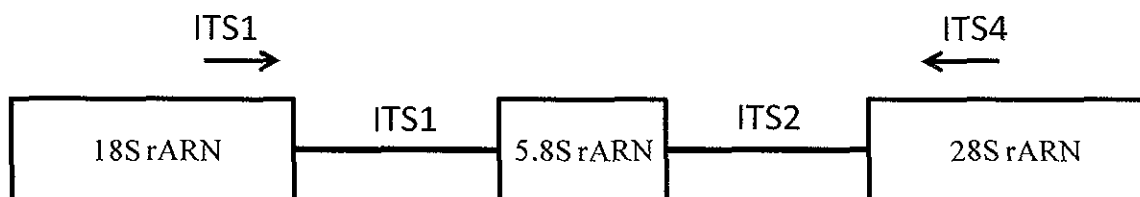


Figura 5. Representación esquemática de los genes ribosomales y la región ITS (Internal transcribed spacer), las flechas pequeñas en dirección opuesta, representan la localización aproximada de los oligonucleótidos universales más utilizados en hongos (Adaptado de Abd-Elsalam et al., 2003).

Soto Sedano et al. (2005), mediante el análisis de secuencias de esta región identificaron a las especies *F. oxysporum* y *F. culmorum* asociadas con la marchitez vascular y pudrición seca del tallo respectivamente, en plantas de clavel producidas en Colombia.

3.2.4. Factor de elongación de la transcripción (EF1 α)

El gen codificante del factor de elongación de la traducción (EF1 α por sus siglas en inglés “Translation Elongation Factor 1 α ”), ha mostrado ser de gran utilidad en el análisis de secuencias para estudios a nivel taxonómico y filogenético de especies del género *Fusarium*. Además, no se han detectado copias no-ortólogas de este gen y se han diseñado oligonucleótidos universales que funcionan para todas las especies de *Fusarium* y otros géneros de hongos (Seifert y Lévesque, 2004). Por ello, fue creada una base de datos con secuencias parciales del EF1 α denominada FUSARIUM-ID v. 1.0, la cual contiene una representación de la diversidad del género *Fusarium* (Geiser et al., 2004). Además están incluidas en las bases de datos generales como el GenBank (International Nucleotide Sequence Database). Pese a que la región parcial de este gen muestra un alto nivel de polimorfismo en su secuencia entre especies relacionadas, los ensayos de PCR para el diagnóstico directo de la especie en concreto son menos sensibles por ser un gen de copia única (Seifert y Lévesque, 2004).

3.2.5. Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción

Los polimorfismos más fáciles de detectar son los que eliminan o crean un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción. Éstos dieron lugar, a los RFLP's que fueron el primer marcador molecular de ADN utilizado. En los RFLP's, los fragmentos de restricción son segmentos de ADN de tamaño definido, que se producen cuando una muestra de ADN es digerida con una endonucleasa de restricción. Una endonucleasa de restricción es una enzima que reconoce una secuencia específica en el ADN (usualmente de cuatro a ocho nucleótidos), y corta dentro o cerca de la misma. Normalmente estas secuencias son palindrómicas y las enzimas cortan ambas cadenas de ADN. Cualquier mutación dentro de estos sitios podría cambiar el patrón de fragmentos obtenidos y permitir que se detecte un RFLP, al comparar dos o más organismos. Las diferencias en el tamaño de los fragmentos son la base para identificar una muestra, y generalmente se utiliza más de una enzima (Moore y Novak, 2002). Esta técnica ha sido ampliamente usada en conjunto con la región ITS o el EF1 α para identificar especies del género *Fusarium* aisladas de remolacha azucarera (Nitschke et al., 2009) y de plantas cucurbitáceas (Chehri et al., 2011).

4. Enfermedades en el cultivo de clavel ocasionadas por especies del género *Fusarium*

Se han reportado dos enfermedades ocasionadas por especies del género *Fusarium* como las más importantes en el cultivo de clavel. La primera y en la que se han hecho más estudios se conoce como “marchitamiento vascular”. Esta enfermedad es considerada la más importante a nivel mundial por las grandes pérdidas económicas que genera (Manulis et al., 1993; Andrés et al., 2001; Garcés de Granada et al., 2001; Bogale et al., 2007; Sarrocco et al., 2007; Soto Sedano et al., 2009). La segunda se conoce como “fusariosis de tallo”, “pudrición basal” o “pudrición seca del tallo”. La etiología de esta enfermedad es confusa debido a que no se han definido claramente los síntomas que la caracterizan, además de que han influido los cambios en la taxonomía del género *Fusarium*. Esta enfermedad cuenta con menos reportes que la anterior pero se ha encontrado en Estados Unidos, Australia, Corea, Venezuela, México Colombia, Inglaterra, Francia, Dinamarca,

Suecia y Nueva Zelanda entre otros (Nelson et al., 1975; Kalc Wright et al., 1997; Suk Han et al., 2001; Trujillo et al., 2005; Martínez Fernández, 2008; Soto Sedano et al., 2009).

4.1 Marchitamiento vascular

Esta enfermedad es causada por *F. oxysporum* Schlecht. f. sp. *dianthi* (Prill. & Del.) Snyd. & Hans., y se propaga principalmente a través de esquejes. Cuando este patógeno se establece en el suelo es prácticamente imposible erradicarlo debido a que produce clamidosporas, que son estructuras de resistencia que pueden permanecer en estado latente y germinar cuando las condiciones sean favorables e iniciar un nuevo ciclo de infección (Andrés et al., 2001).

4.1.1. *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*

Es una subespecie patógena de *F. oxysporum*, la cual es hospedero-específica de clavel. Dentro de esta forma especial, se han descrito once razas agrupadas en seis grupos de compatibilidad vegetativa, como se muestra en la tabla I (Andrés et al., 2001; Manulis et al., 1993; Leslie et al., 2006).

Tabla I. Subespecies de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, descritas por Garibaldi (Andrés et al., 2001).

Especie	Razas fisiológicas	Grupo de Compatibilidad Vegetativa
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i>	4	0020
	2,5,6 y 7	0021
	1 y 8	0022
	11	0025
	10	0027
	9	0028

La raza 2 es la que tiene mayor distribución alrededor del mundo. La raza 3 fue reclasificada como *F. redolens* f. sp. *dianthi* raza 3. Las razas 1 y 8 están asociadas con claveles del Mediterráneo y se han encontrado en Italia, Francia y España. La raza 4 ha

sido encontrada en Estados Unidos, Italia, Israel, España y Colombia. Las razas 5, 6 y 7 fueron reportadas por Garibaldi (1983) en claveles de Gran Bretaña, Francia y Holanda, pero sólo se dispone de un representante individual de cada una. En Italia han sido reportadas ocho razas fisiológicas. Finalmente tres nuevas razas fueron descritas (9, 10 y 11); la raza 9 se encontró en Australia y las razas 10 y 11 se encontraron en Holanda (Chiocchetti et al., 1999; Garcés de Granada et al., 2001).

4.1.2. Síntomas de la enfermedad

Los daños ocasionados por este patógeno, se caracterizan por la aparición unilateral de síntomas de marchitez, acompañada del amarillamiento parcial de las hojas y el doblamiento de los brotes hacia el lado enfermo de la planta. Paulatinamente el color verde del follaje va adquiriendo un color amarillo paja. En la etapa final de la enfermedad, la planta se marchita completamente y muere, observándose que las raíces permanecen sin sufrir daños (Figura 6a). Un aspecto muy importante para el diagnóstico de la enfermedad, que la diferencia fácilmente de otras enfermedades vasculares, es la aparición de una decoloración blanquecina, amarillenta o marrón en los haces vasculares y el daño en los tejidos (Figura 6b) sin afectar la médula (Garcés de Granada et al., 2001; Martínez Fernández, 2008).

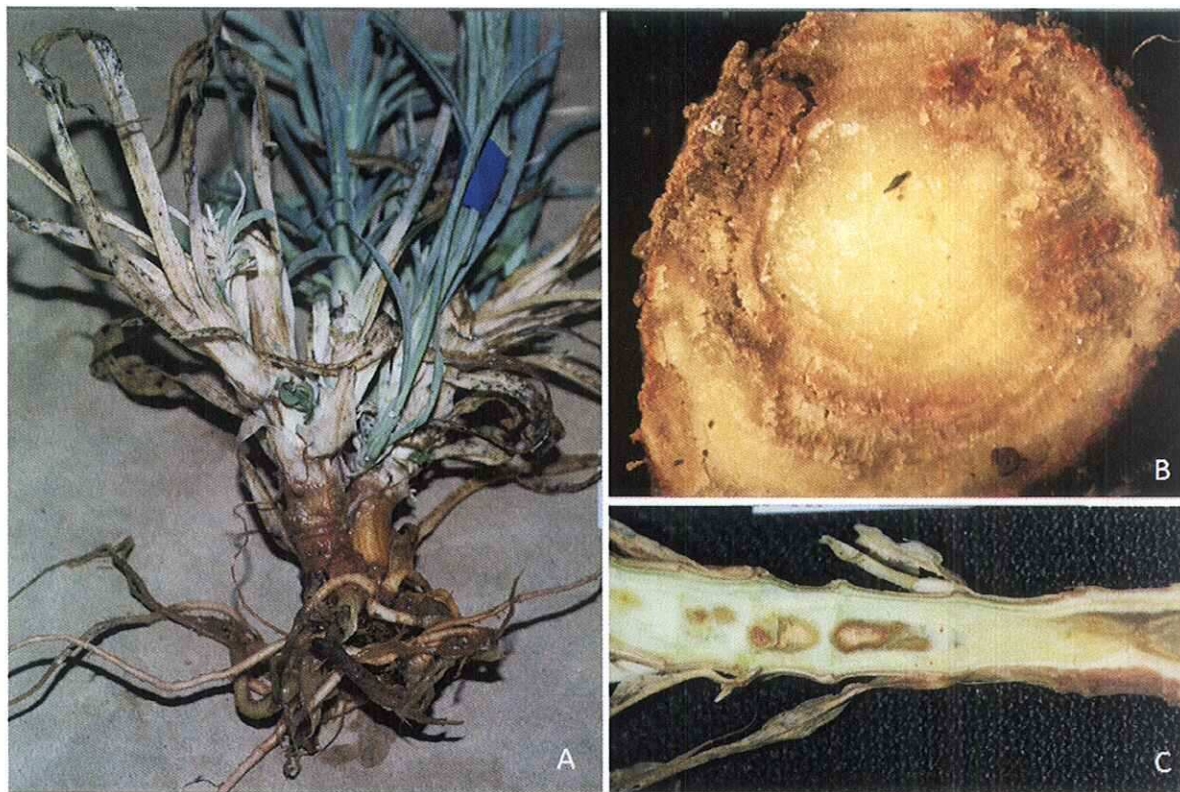


Figura 6. Síntomas de marchitez vascular en plantas de clavel. a) síntomas externos, b y c) síntomas internos.

4.1.3. Ciclo de infección

La enfermedad inicia con la germinación de estructuras de resistencia, ya sea, clamidosporas o micelio presentes en los restos de la cosecha o en el suelo, estimuladas por los exudados que producen las raíces de las plantas. Las hifas del hongo penetran a través de heridas hechas en forma mecánica, por nematodos o insectos. Pero la forma más común de penetración es a través de la epidermis de las raíces, pasando por la corteza y la endodermis, hasta llegar a los vasos del xilema. El hongo coloniza el xilema, obstruyendo los vasos al crecer en forma de micelio o por el transporte pasivo de microconidios, lo que interfiere con la traslocación de agua y nutrientes, provocando el debilitamiento, la marchitez y la muerte de los órganos de la planta. Cuando estos órganos caen al suelo el hongo se reincorpora para iniciar un nuevo ciclo de infección.

El transporte pasivo de microconidios, contribuye a una colonización no uniforme, lo que puede hacer que el material de propagación aparentemente sano realmente este infectado. La colonización del tallo es unilateral, debido a que la diseminación lateral y radial del hongo parece ser inhibida por las paredes celulares y otras barreras laterales de la planta. La oclusión de los vasos del xilema juega un papel muy importante en la resistencia de las plantas, ya que las variedades resistentes, tienen la capacidad de regenerar nuevos vasos del xilema, creando nuevas vías de transporte de agua para compensar los vasos destruidos. En las plantas infectadas el patógeno permanece casi exclusivamente en los tejidos vasculares hasta que la planta muere (Agrios, 2005).

4.2. Pudrición basal

Esta enfermedad está asociada principalmente con tres especies: *F. avenaceum* (Fr.) Sacc., *F. culmorum* (W. G. Smith) Sacc. y *F. graminearum* Schwabe. Anteriormente estas especies se conocían bajo los nombres de *Fusarium roseum* (Lk.) emend. Snyder & Hans. y *Fusarium roseum* f. sp. *cerealis* (Cke) Snyder & Hans. (Kalc Wright et al., 1997). Debido a esto, la etiología de esta enfermedad no está claramente definida y ha sido nombrada de diferentes maneras como: pudrición basal, pudrición de ramas, muerte descendente, muerte descendente del tallo y pudrición seca del tallo (Suk Han et al., 2001). Los síntomas generales que la caracterizan son marchitez, pudrición seca en la base del tallo con aspecto café-rosado, necrosis y médula afectada, así como muerte descendente de la planta (Soto Sedano et al., 2005). Esta enfermedad es muy importante en todas las fases de desarrollo de la planta, incluso durante el proceso de enraizamiento de los esquejes. Se ha reportado que la muerte descendente del tallo ocurre sobre todo cuando se realizan heridas en la planta, ya sea por poda, inducción de tallos secundarios, propagación de esquejes o en la cosecha de flores (Suk Han et al., 2001).

4.2.1. *Fusarium graminearum*

Es un hongo que tiene distribución cosmopolita. Su estado sexual es conocido como *Gibberella zeae* Schwein (Petch). En el cultivo de clavel, esta especie se ha reportado principalmente asociada a la “muerte descendente del tallo” en el noreste de Estados Unidos, en donde esta enfermedad ocurre frecuentemente. Nelson y colaboradores (1975) mencionaron que ésta es una enfermedad recurrente en el cultivo y que en muchas ocasiones ha sido el principal factor limitante de la producción. En Queensland, Australia al igual que en Corea, esta especie se ha reportado como el agente causal de esta enfermedad (Kalc Wright et al., 1997 y Suk Han et al., 2001).

4.2.2. *Fusarium avenaceum*

Su estado sexual es conocido bajo el nombre de *Gibberella avenacea* Cook. Es una especie que puede encontrarse en regiones templadas como saprófito o patógeno en el suelo (Leslie et al., 2006). En el cultivo de clavel, esta especie se ha reportado en Victoria, Australia, causando pudrición basal del tallo y muerte regresiva (Kalc Wright et al., 1997).

4.2.3. *Fusarium culmorum*

Es una especie que se encuentra comúnmente en regiones templadas. No se conoce su estado sexual. Se ha reportado como el agente causal de la pudrición seca del tallo en clavel en Victoria, Australia (Kalc Wright et al., 1997), en la Sabana de Bogotá, Colombia (Soto Sedano et al., 2005) y en México, en Morelos y el Estado de México (Martínez Fernández, 2008).

5. Especies del género *Fusarium* reportadas en el cultivo de clavel en México

Hasta la fecha los trabajos que se han realizado en México, en cuanto a la identificación de especies del género *Fusarium* en el cultivo de clavel, se han basado sólo en la caracterización morfológica. García García y Camargo Ricalde (2006), realizaron un

estudio de identificación a nivel morfológico de los hongos fitopatógenos del clavel producido en Xochimilco, Distrito Federal y reportaron a *F. oxysporum* como la especie con mayor porcentaje de incidencia.

Martínez en el 2008, realizó una investigación similar en el estado de Morelos, donde también reportó a *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* junto con *F. roseum* y *Rizoctonia solani* afectando la raíz y la base de los tallos de clavel. Este autor cita a Espinoza (1973), quien reportó a *F. roseum* como agente causal de la pudrición de tallos en los cultivos de clavel producidos en el municipio de Villa Guerrero, Estado de México y consideran a este hongo como el principal patógeno del cultivo. Martínez Fernández (2008), también cita a Lamas (1978), quien reportó a *F. poae* L. y *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* como patógenos del cultivo en Xochimilco.

III. Justificación

A nivel mundial, en las zonas donde se produce clavel, uno de los principales factores limitantes de la producción son las enfermedades ocasionadas por especies del género *Fusarium*, las cuales generan grandes pérdidas económicas. En países donde la actividad económica depende de la floricultura, tales como Colombia, España, Australia, entre otros, y con el propósito fundamental de mejorar las estrategias de control de las enfermedades, se han realizado investigaciones enfocadas a la identificación a nivel morfológico y molecular de estas especies. En México, únicamente se han identificado a nivel morfológico las especies del género *Fusarium* patógenas de clavel en los Estados de Morelos, Estado de México y el Distrito Federal. En Baja California, que es un Estado importante en la producción y exportación de clavel hacia Estados Unidos, no se han identificado las especies del género *Fusarium* presentes en la zona de cultivo.

IV. Objetivos

Objetivo General

Determinar la variabilidad interespecífica de las cepas del género *Fusarium* aisladas de diferentes cultivares de clavel con síntomas de marchitez en la zona florícola de Baja California.

Objetivos Específicos

Aislar cepas del género *Fusarium* de distintos cultivares de clavel con síntomas de marchitez.

Identificar morfológicamente, a nivel de especie, cepas del género *Fusarium* aisladas de distintos cultivares de clavel con síntomas de marchitez.

Identificar molecularmente, a nivel de especie, cepas del género *Fusarium* aisladas de distintos cultivares de clavel con síntomas de marchitez.

V. Hipótesis

Se encontrará variabilidad interespecífica y se identificarán especies del género *Fusarium* potencialmente patógenas y saprófitas asociadas a diferentes cultivares de clavel con síntomas de marchitez en la zona florícola de Baja California.

VI. Materiales y métodos

1. Colecta de muestras

Se realizaron muestreos en cuatro ranchos ubicados en los municipios de Ensenada y Playas de Rosarito, entre los meses de septiembre y diciembre del año 2010. En la tabla II se presentan los sitios y cultivares muestreados. En cada sitio, se colectaron una o dos plantas por cada cultivar con síntomas visibles de marchitez. Las muestras se colocaron en bolsas de polietileno, se etiquetaron y se trasladaron al laboratorio de Fitopatología del CICESE.

Tabla II. Ubicación de los sitios de muestreo y cultivares de clavel bajo estudio.

Municipio	Rancho	Cultivar	
Ensenada	Twins	• Capri • W. Fleurette • Delphi • Vega	• Fleurette • Euforia • Mixto* • Chateau
	Pacífico	• Nelson	
Playas de Rosarito	Toro	• Nelson • Raggio di sole • Vesuvio	• Pink Nelson • Bright Rendez Vous • Delphi
	Rosalera	• Cherry Tessino • Pink Nelson • Mini* • Arévalo • Lion King • Tabor	• Mini blanca* • Rendez Vous • Fushia* • Tía María • Mini roja* • Delphi • Rosita*

*Nombre del cultivar desconocido, por lo tanto, es un nombre asignado y para fines de este estudio se consideraron como cultivares.

2. Aislamiento y purificación de cepas

De cada una de las plantas colectadas se intentó el aislamiento de cepas de *Fusarium* spp. de la corona y del tallo. Para ello, a las plantas se les eliminó el follaje, y los restos de suelo se eliminaron lavando con agua corriente y secando superficialmente. Para visualizar los daños, se realizaron cortes transversales y longitudinales, desinfectando en cada corte la navaja utilizada con alcohol y fuego. De la corona y del tallo se cortaron trozos de tejido sintomático de aproximadamente 5 mm², que se desinfectaron superficialmente sumergiéndolos rápidamente en alcohol al 95% y flameando. Al final, se sembraron equidistantemente cuatro trozos de tejido en cajas Petri de 9 cm de diámetro que contenían medio de cultivo de agar papa dextrosa (PDA; Difco®) adicionado con cloranfenicol (15 µg/ml), para evitar crecimiento bacteriano. Las cajas se incubaron a 25 ±2°C en total oscuridad. Cuando los hongos comenzaron a colonizar el medio, aproximadamente tres días después y con el fin de obtener cultivos puros, se resembraron en PDA fresco sólo aquellos con características propias del género *Fusarium*. En algunos casos se aisló más de una cepa por planta, por lo tanto se usó la siguiente nomenclatura para designarlas:

Ejemplos: FTW5C, FPA4aT, FTO1T y FRO13cC

Donde:

Patógeno

F = *Fusarium*

Rancho

TW = Twins

PA = Pacífico

TO = Toro

RO = Rosalera

Muestra

No.= Número consecutivo de planta por rancho

a, b o c = Cepas fenotípicamente diferentes recuperadas por planta

Parte de la planta donde fue aislado

C= Corona

T= Tallo

3. Cultivos monospóricos

A partir de cultivos puros de *Fusarium* spp., se generaron cepas monospóricas, para ello se hizo una suspensión con aproximadamente 50 esporas/ml en agua destilada estéril. De esta suspensión, se tomaron 20 µl que se distribuyeron sobre una caja Petri de 9 cm de diámetro que contenía medio de cultivo PDA, y se incubaron a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 h en oscuridad. Transcurrido este tiempo, usando un microscopio estereoscópico Olympus SZX12, se recuperó una sola espora germinada y se transfirió a medio PDA fresco.

4. Preservación de cepas

Cada cepa monospórica de *Fusarium* spp. se colocó en medio de cultivo de Agar-Clavel (CLA, 20 g agar/L agua adicionado con hojas de clavel estériles) y cuando las hojas de clavel adicionadas al medio estaban completamente colonizadas por el hongo, éstas se transfirieron a un tubo de 2 ml. Se agregó 1 ml de leche descremada estéril, se liofilizaron y finalmente se resguardaron a 4°C .

5. Identificación morfológica

Para identificar las cepas del género *Fusarium* a nivel de especie, se hizo un análisis comparativo basándose en el Manual de Laboratorio de *Fusarium* escrito por Leslie et al. (2006). Para poder realizar este análisis, las cepas se crecieron en tres medios de cultivo: PDA, CLA y SNA (para preparar un litro: KH_2PO_4 (1g), KNO_3 (1g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.5g), KCL (0.5g), glucosa (0.2g), sucrosa (0.2g), agar (20g)).

5.1 Características morfológicas evaluadas en PDA

Cada cepa se creció en medio de cultivo PDA, colocando un disco de micelio de 7 mm de diámetro en el centro de una caja petri de 9 cm. Después de dos semanas, se analizaron las características de la colonia, tales como: morfología, pigmentación, producción de esporodoquios y esclerocios. Con una cámara digital SLR Nikon D3000 de 10.2MP se tomaron fotografías en el adverso y reverso de las colonias para evidenciar la pigmentación

y formación de estructuras. Los esporodoquios y esclerocios de tamaño microscópico se observaron en un microscopio estereoscópico Olympus SZX12 y se tomaron fotografías con una cámara DP70 integrada al mismo; las imágenes se editaron usando el software computacional DPController.

5.2 Características morfológicas evaluadas en CLA y SNA

Cada cepa se creció en medio de cultivo CLA y SNA a 25 ± 2 °C en total oscuridad. Después de un lapso de cuatro a siete días y para caracterizar la forma y tamaño de macroconidios, los microconidios y las células conidiogénicas, las cepas se analizaron mediante la técnica de bloque invertido usando microscopía de campo claro en un microscopio óptico invertido Axiovert 200 Zeiss®. Para el análisis de clamidosporas, las cepas se mantuvieron en cultivo durante siete días más y se caracterizaron usando la misma técnica. Las imágenes se tomaron y editaron con el programa AxioVision 4.7.

6. Identificación molecular

6.1. Extracción de ADN

Las cepas se crecieron en 25 ml de medio PDB (Potato Dextrose Broth, Difco®) en agitación constante a 150 rpm y 30 °C durante 3 días. El micelio se recuperó por filtración, se lavó con agua destilada estéril y se liofilizó. Para la extracción de ADN, se utilizó el sistema comercial DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen®), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para verificar la eficiencia de la extracción, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% con Tris-Acetato-EDTA (TAE), a 70V durante 40 min; utilizando 3 µl de muestra. El ADN se tiñó con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) y se visualizó bajo luz UV. Para corroborar el peso molecular del ADN obtenido, se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (Labnet International, Inc.). Todas las muestras se ajustaron a una concentración de 25 ng/µl utilizando un nanodrop (GE NanoVue).

6.2. Amplificación del espaciador transcrito interno (ITS1-5.8s-ITS2)

La región del espaciador transcrito interno (ITS, por sus siglas en inglés) de *Fusarium* spp. se amplificó mediante la técnica de PCR, utilizando los oligonucleótidos universales ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (White et al., 1990). El fragmento amplificado esperado tiene un tamaño aproximado de 550 a 570 pb (Lee et al., 2000). La amplificación se realizó usando 50 µl de mezcla de reacción que contenía: 50 ng de ADN genómico, 25 pmol de cada primer, 1.25 U de Taq ADN polimerasa (Fermentas), 25 µl de Buffer FailSafe™ PCR 2X PreMix E (Epicentre® Biotechnologies) y agua destilada estéril para completar el volumen final. La mezcla se colocó en un termociclador Bio-Rad modelo MJ Mini™ bajo el siguiente programa: desnaturalización inicial por 4 min a 95°C; 35 ciclos de 1 min cada uno de desnaturalización, alineamiento y extensión a 95°C, 58°C y 72°C, respectivamente; y una extensión final de 10 min a 72°C. Para corroborar la presencia de amplicones, se utilizaron 3 µl de muestra para realizar una electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, a 80V durante 40 min. Los fragmentos se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron bajo luz UV. Para estimar el tamaño de los fragmentos, se utilizó un marcador de 100 pb (Labnet International, Inc.). El ADN amplificado se precipitó agregando a las muestras 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío y 1:10 volúmenes de acetato de sodio (3M, pH=8). Las muestras se centrifugaron durante 25 min, se descartó el sobrenadante, se lavaron con etanol al 70% para eliminar las sales, se dejó secar la pastilla y finalmente, el ADN se diluyó en 20 µl de buffer AE (Tris-EDTA, pH 8.0 (10 mM, 1 mM)).

6.3. Análisis por polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP)

Con los fragmentos obtenidos de la región ITS, se realizó un análisis RFLP, usando las enzimas *MspI* y *SmaI* (Tabla IV). La reacción de restricción se llevó a cabo utilizando 4 µl del producto amplificado y 12 unidades de una de las dos enzimas, siguiendo las instrucciones del fabricante (BioLabs® Inc.). Los fragmentos resultantes se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2.5%, a 80V durante 150 min, se tiñeron con

bromuro de etidio y se visualizaron bajo luz UV. Para estimar el tamaño de los fragmentos de restricción, se utilizó un marcador de 100 pb (Labnet International, Inc.).

Tabla III. Enzimas utilizadas para un análisis de restricción en la región ITS de *Fusarium* spp.

Enzima de restricción	Sitio de reconocimiento
<i>MspI</i>	5'...C [▼] CGG...3' 3'...GGC [▲] C...5'
<i>SmaI</i>	5'...CCC [▼] GGG...3' 3'...GGG [▲] CCC...5'

6.4. Análisis del Factor de Elongación de la Traducción 1α (EF1α)

Utilizando los oligonucleótidos universales EF1-728 (5' CATCGAGAAGTTCGAGAAGG 3') (Carbone y Kohn, 1999) y EF2 (5' GGA(G/A)GTACCAGT(G/C)ATCATGTT 3') (O'Donnell et al., 1998), se amplificó un fragmento del gen que codifica para el factor de elongación de la traducción 1α. La amplificación se realizó en 25 µl de una mezcla de reacción que contenía: 50 ng de ADN genómico, 50 pmol de cada primer, 1.25 U de Taq ADN polimerasa (Fermentas), 2.5 µl de Buffer 10X Master AmpTM PCR Enhancer con betaína (Epicentre[®] Biotechnologies), 0.5 µl de dNTP's (20 mM), 4 µl de MgCl₂ (25mM) y agua destilada estéril para completar el volumen final. La mezcla se colocó en un termociclador Bio-Rad modelo MJ MiniTM bajo el siguiente programa: desnaturalización inicial por 4 min. a 95°C; 40 ciclos de 1 min cada uno de desnaturalización, alineamiento y extensión a 94°C, 50°C y 72°C, respectivamente; y una extensión final de 10 min a 72°C. Para corroborar la presencia del fragmento amplificado, se utilizaron 3 µl de muestra para realizar una electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, a 80V durante 40 min. Los fragmentos se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron bajo luz UV. Para estimar el tamaño del fragmento, se utilizó un marcador de 100 pb (Labnet International, Inc.). Los fragmentos amplificados se purificaron usando el kit QIAquick[®] (Quiagen[®]), siguiendo las

indicaciones del proveedor. Posteriormente se realizó nuevamente una electroforesis con las mismas condiciones y se cuantificó la cantidad de producto amplificado. Las muestras se enviaron a secuenciar a Clemson University Genomics Institute, Carolina del Sur, Estados Unidos, para ello, previamente se prepararon ajustando la concentración de producto amplificado y adicionando el oligonucleótido correspondiente con la finalidad de obtener secuencias de ambas direcciones.

6.6 Análisis de secuencias del EF1 α

Una vez obtenidas las secuencias, se accedió al banco de datos (GenBank) de “The National Center for Biotechnology Information” (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y utilizando el algoritmo de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) se realizó un análisis comparativo de las secuencias de *Fusarium* spp. obtenidas del EF1 α con las existentes en esta base de datos. Las secuencias también se compararon con la base de datos de FUSARIUM-ID (<http://isolate.fusariumdb.org>). Este sitio web contiene secuencias de marcadores filogenéticos de la mayoría de las especies del género *Fusarium* conocidas (Derechos reservados Seogchan Kang's Lab, *Fusarium* Research Center, and Fungal Bioinformatics).

Por último se analizaron en conjunto los resultados obtenidos de la caracterización morfológica y molecular para concluir la identificación de especies del género *Fusarium*.

VII. Resultados

1. Síntomas de marchitez en plantas de clavel

En los cuatro sitios de muestreo, los síntomas de marchitez mostrados por las plantas fueron muy similares. En el follaje se observaron hojas secas color paja en la base de las plantas (Figura 7a). En la parte externa de los tallos, principalmente en las plantas maduras, se observaron tonalidades rosa-marrón, agrietamiento y apariencia de leña seca (Figura 7a); mientras que en la parte interna se observó marchitez vascular manifestada por decoloración y tonalidades marrón en los haces vasculares y en la médula (Figura 7b y 7c). Por otro lado, la mayoría de las raíces mostraron apariencia sana y sólo en algunos casos se encontraron nódulos característicos de la presencia de nemátodos (Figura 7d).



Figura 7. Síntomas característicos de marchitez encontrados en claveles de la zona muestreada. a) hojas secas color paja y tallo rosa-marrón, b) corte longitudinal del tallo mostrando síntomas de marchitez vascular, c) corte transversal a nivel de corona mostrando los haces vasculares y médula afectados, d) planta con apariencia de leña seca y raíz afectada por nemátodos.

2. Cepas de *Fusarium* spp. aisladas de diferentes cultivares de clavel

En total se muestrearon 24 cultivares, de los cuales se aislaron y purificaron 64 cepas con características propias del género *Fusarium*. Las cepas obtenidas por sitio de muestreo y por tejido de la planta del cual fueron aisladas, se describen a continuación.

Rancho Twins: en este sitio se tomaron muestras de ocho cultivares; se aisló una sola cepa por cultivar, excepto para uno de ellos (Chateau) de donde se aislaron dos, una de la corona y otra del tallo; de esta manera se obtuvieron en total nueve cepas, seis de la corona y tres del tallo.

Rancho Pacífico: en este sitio se tomaron muestras de cuatro plantas, todas del cultivar Nelson, por ser el único en el momento de muestreo; de estas plantas se aislaron nueve cepas, cinco del tallo y cuatro de la corona.

Rancho El Toro: en este sitio se muestrearon seis cultivares y se tomaron dos muestras de cada uno; de éstas se aislaron 17 cepas, diez de corona y siete de tallo; sólo en el cultivar Bright Rendez Vous se aislaron dos cepas de la corona fenotípicamente diferentes de la misma planta.

Rancho La Rosalera: en este sitio se tomaron muestras de 13 cultivares; de ellos, se aislaron 29 cepas, 16 de corona y 13 de tallo. Únicamente de los cultivares Delphi, Tabor y Pink Nelson, se aisló más de una cepa fenotípicamente diferente de una misma planta. En la tabla IV, se muestran los datos con el nombre, cultivar y sitio del cual se aisló cada cepa.

3. Caracterización morfológica

3.1 Morfología de la colonia en medio PDA

En este medio de cultivo se analizaron las características del micelio y la pigmentación en el adverso y reverso de las colonias. En general, las cepas presentaron micelio con apariencia algodonosa (Figuras 8a, 8d, 8j, 8k y 8l), flocosa (Figuras 8b, 8c, 8e, 8f, 8g y 8i) y plana (Figura 5h). En algunas cepas el crecimiento del micelio fue escaso (Figuras 8a y 8h) y en otras muy abundante y denso (Figuras 8j, 8k y 8l). En cuanto a pigmentación, se observaron varias tonalidades: púrpura, rosa, crema, blanco, amarillo y rojo, en el adverso y reverso de las colonias. El color púrpura con diferente nivel de intensidad, es decir, más claro u oscuro, fue el más común. El pigmento rojo sólo lo presentaron las cepas FRO13cC y FRO13cT, las cuales fueron aisladas de la corona y tallo de la misma planta del cultivar Delphi del rancho La Rosalera. La cepa FRO8C (Figura 8g), aislada de la corona del cultivar Rendez Vous, fue la única que presentó pigmentación rosa en el micelio y marrón intenso en el reverso de la colonia. Las cepas FPA1T (Figura no mostrada) y FTO1T (Figura 8j), aisladas del tallo del cultivar Nelson de los ranchos Pacífico y El Toro respectivamente, fueron las únicas que presentaron pigmento amarillo intenso en el micelio. Por otra parte, las cepas FTW11C, FRO3T, FRO6T, FRO13bC (Figuras no mostradas) y FRO13bT (Figura 8k), presentaron puntos o manchas color marrón en el reverso de la colonia; ésta es una característica importante en la identificación de algunas especies, tales como *F. semitectum* y *F. equiseti*.

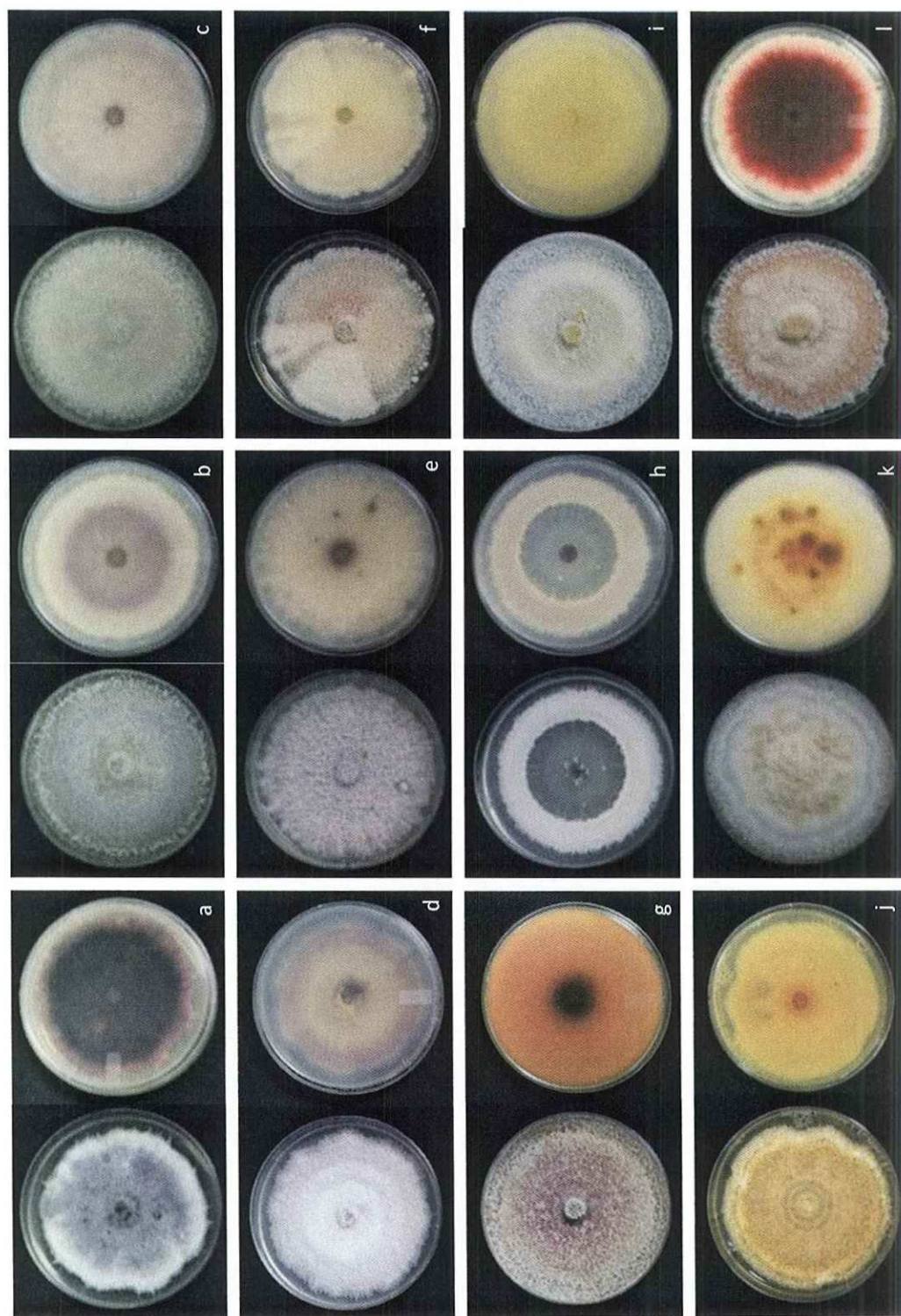


Figura 8. Morfología y pigmentación de cepas del género *Fusarium* aisladas de clavel en medio PDA. a) FTO4T, b) FTO7T, c) FTO12C d) FTO13aT, e) FTO5aC, f) FTO8C, g) FTO11T, h) FTO9C, i) FTO13bT, j) FTO13cT, k) FTO13dT, l) FTO13eT.

3.2 Producción de esporodoquios y esclerocios

Una característica morfológica importante para la identificación de especies del género *Fusarium* es la producción de esporodoquios y otra, aunque se considera como un carácter secundario de identificación, es la producción de esclerocios. En medio de cultivo PDA las cepas FTW13C, FPA4bC, FPA4bT, FTO4C, FTO5aC, FTO5T (Figuras 9a, 9b, 9c, 9d, 9e y 9f, respectivamente) FTW11C, FTW13T, FPA2C, FPA4aC, FPA1T, FTO1C, FTO2C, FTO3C, FTO7C, FRO2bC, FRO8C, FRO9C y FRO10C (Figuras no mostradas), produjeron esporodoquios y esclerocios con un tamaño lo suficientemente grandes para poder observarlos a simple vista. Ambas estructuras fueron encontradas de manera superficial o sumergidos en el micelio. En algunos casos se encontraban distribuidos en toda la colonia y en otros aislados formando grupos (Figura 9).

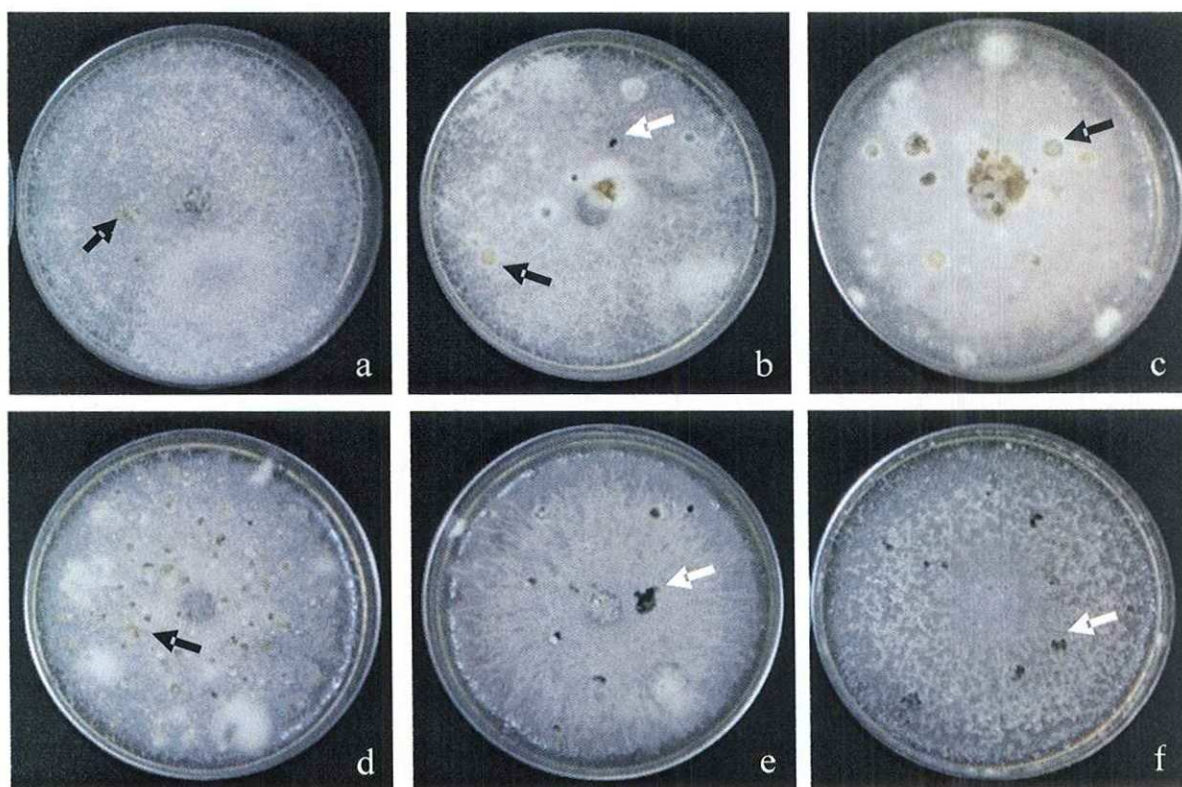


Figura 9. Cepas de *Fusarium* spp. crecidas en PDA mostrando la producción de esporodoquios y esclerocios. a) FTW13C, b) FPA4bC, c) FPA4bT, d) FTO4C, e) FTO5aC y f) FTO5T. Flechas negras y blancas indican esporodoquios y esclerocios respectivamente.

Los esclerocios observados presentaron tres tonalidades: púrpura muy intenso, verde-azulado y negro (Figuras 10a, 10b, 10c respectivamente), su textura fue rugosa y su consistencia dura.

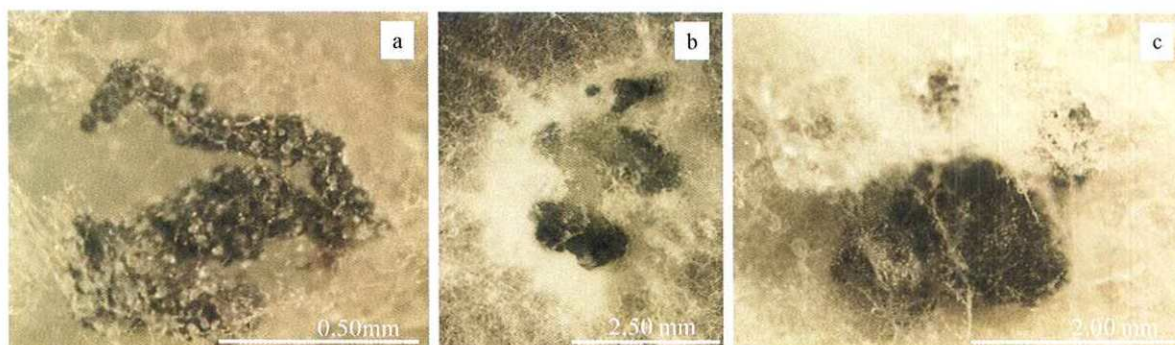


Figura 10. Esclerocios producidos por cepas de *Fusarium* spp. en medio PDA. a) FRO7C, b) FRO2bC y c) FRO10C.

Los esporodoquios por su parte presentaron tonalidades crema, naranja pálido y naranja intenso; con aspecto gelatinoso y morfología variable (Figura 11). Las mismas cepas que formaron esporodoquios en PDA, lo hicieron también en medio de cultivo CLA, por ejemplo las cepas FTW11C y FPA2C (Figuras 11f y 11i). En cambio, los esclerocios sólo se observaron en medio PDA.

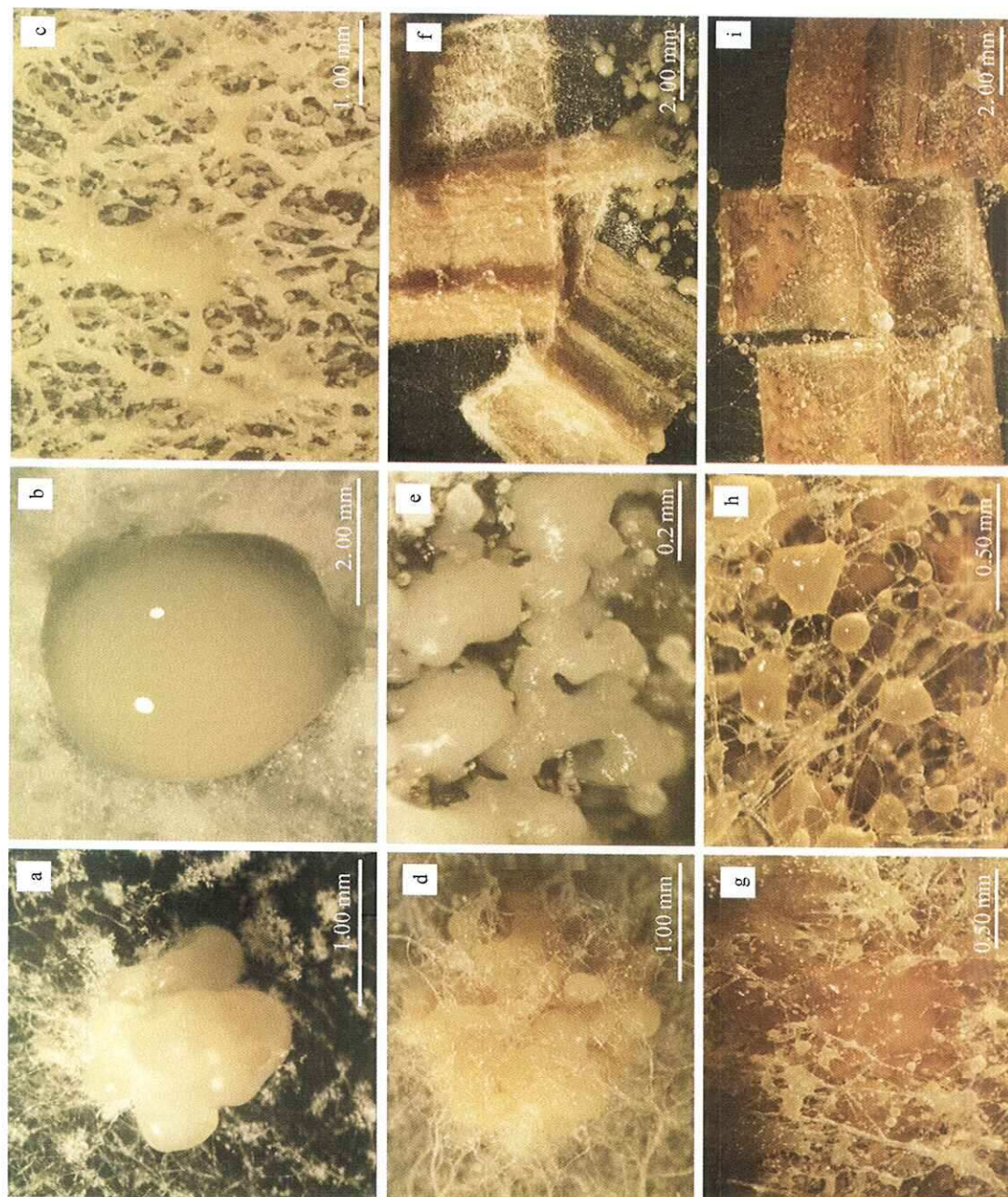


Figura 11. Esporodocios de *Fusarium* spp. producidos en medios PDA (a-e y g-h) y CLA (f, i). a) FPA4bC, b) FPA4bT, c) FRO3T, d) FRO9C, e y f) FPA2C, g) FPA1T, h e i) FTW11C.

3.3. Características microscópicas analizadas en medio de cultivo CLA y SNA

3.3.1 Macroconidios

Se observó mayor producción de macroconidios en CLA que en SNA, debido a que las hojas de clavel promueven la producción de estos (Fisher et al., 1981). La forma más común de los macroconidios fue de “media luna o canoa”, con algunas variaciones en cuanto al tamaño, grosor y número de septos, entre otras. Los macroconidios formados en esporodoquios presentaron una morfología bastante uniforme y clara (Figuras 12a y 12b) y fueron muy fáciles de observar. Cabe destacar que no en todas las cepas se detectó la presencia de estas estructuras. Las características de los macroconidios observados se resumen en la tabla V.

Tabla V. Diferencias morfológicas de macroconidios producidos en CLA por diferentes cepas.

Tamaño (cualitativo)	Forma	Septos	Base	Ápice	Figura	Cepas
30-35µm	Ligeramente curvados y delgados	*	Ligeramente curvado	Ligeramente redonda	12c 12d	FTW12C FPA4bC
20-25µm	Recta y ancha	3-6	Redonda	Redonda	12e	FPA2C FPA4Ac FRO1C FRO2aC
25-30µm	Alargada, delgada y casi recta	3-5	Curvado	Forma de pie	12f	FTW7T FTW13T
20-30µm	Curvatura dorsal	5	Curvado	Redonda	12g 12h	FTW11C FTO5bC FRO6T
18-20µm	Ligeramente curvada,	3-4 *	Curvado o con forma de gancho	Forma de pie	12i 12j	FTW5C FTW6C FTW10C FTW13C FPA3C FPA2T FPA3T FPA4aT FPA4bT FTO2C FTO3C FTO5aC FTO6C FTO7C FTO11C FTO3T FTO4T FTO5T
						FRO7T FTO8T FTO11T FRO2bC FRO3C FRO6C FRO10C FRO11C FRO12C FRO14C FRO2aT FRO2bT FRO3T FRO7T FRO8T FRO9T FRO10T FRO13aT

* septos no claros bajo el microscopio, pero no significa que no presente.

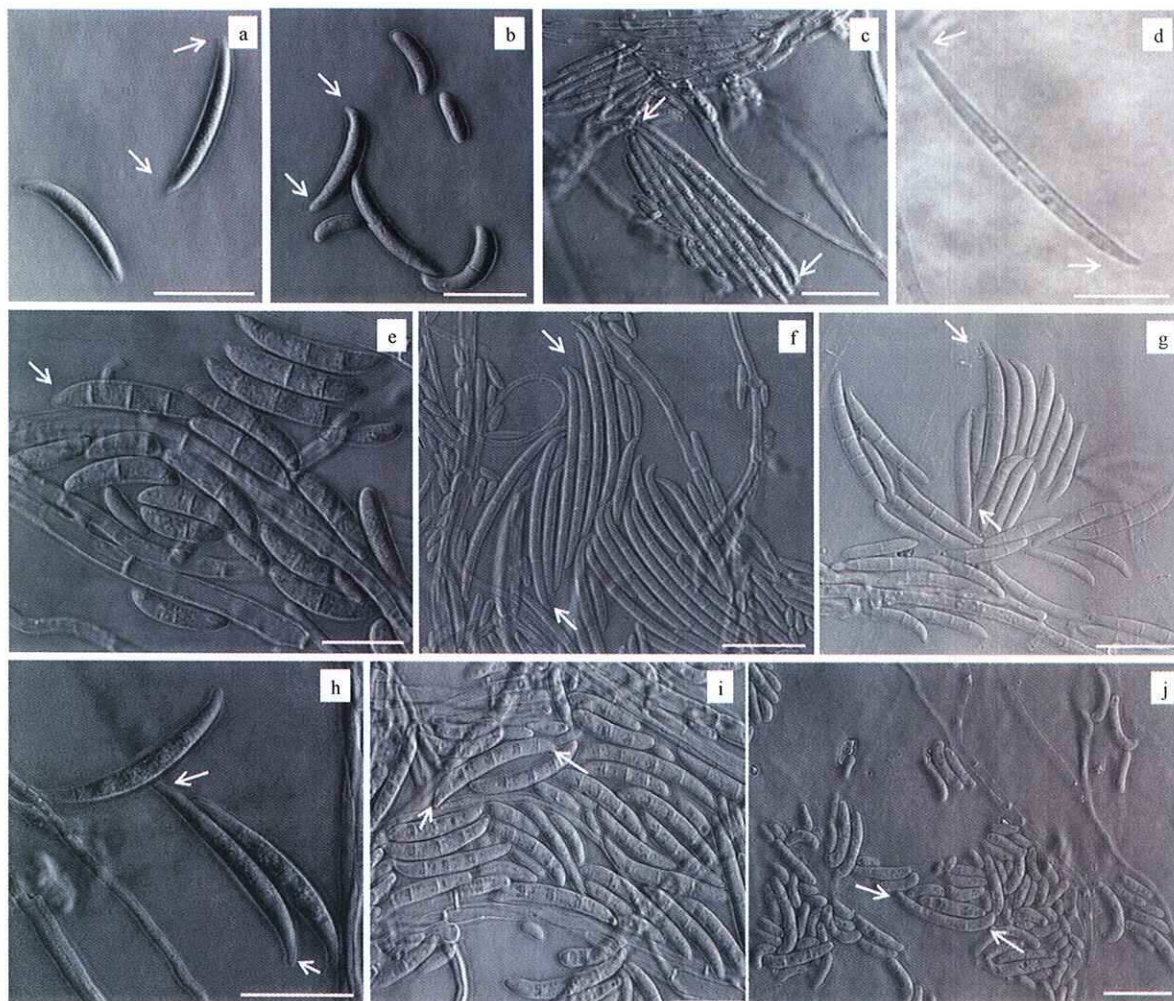


Figura 12. Macroconidios de *Fusarium* spp. en medio CLA. a) FRO3T y b) FRO8C extraídos de esporodocios, c) FPA4bC, d) FTW12C, e) FRO8C, f) FTW7T, g) FRO13bT, h) FRO6T, i) FTO4T, j) FTO11C. Barra de escala 10µm.

3.3.2. Microconidios

La presencia de microconidios se observó claramente en CLA y SNA. Casi todas las cepas produjeron microconidios, a excepción de las cepas FTW11C, FTO5bC, FRO6T, FRO13bC y FRO13bT que en lugar de éstos, produjeron mesoconidios. Estas estructuras se distinguen por tener un tamaño intermedio entre macro y microconidios (Figura 13a) y suelen ser producidos por varias especies del género *Fusarium*, entre ellas *F. semitectum*. La forma de los microconidios fue variable en el resto de las cepas. La cepa FTW12C, fue

la única en la que se observaron los tipos de microconidios ovoide con base truncada, napiformes-piriformes y globosos (Figura 13b); este tipo de conidios es característico de las especies *F. globosum* y *F. beomiforme*.

Las cepas FRO13cC y FRO13cT, fueron las únicas que produjeron pigmentos rojos en el adverso y reverso de la colonia y tres tipos de microconidios: piriformes, napiformes, y ovals, con cero o un septo, y en algunos se observó una papila en la base del conidio (Figura 13c). Las especies del género *Fusarium* que suelen presentar estas características son: *F. tricinctum*, *F. poae*, *F. sporotrichioides* y *F. clamydosporum*.

Las cepas FPA2C, FPA4aC, FRO1C, FRO1T, FRO2aC, FRO5C, FRO8C, y FRO9C produjeron microconidios uniformemente grandes, ovals o elípticos, generalmente con uno o dos septos; esta morfología es muy característica de la especie *F. solani* (Figura 13d).

Las cepas FTW7T, FTW8T, FTW13T, FTO1C, FTO4C, FRO4T FRO4C y FRO7C, produjeron microconidios de forma oval con base truncada y sin septos; este tipo de morfología la presentan varias especies del género *Fusarium*, entre otras, *F. proliferatum* y *F. verticillioides* (Figura 13e).

En las cepas FPA1T, FTO1T y FTO9C no se observó producción de macroconidios; éstas sólo produjeron microconidios de manera muy abundante, con forma oval, sin septos y muy uniformes en tamaño (Figura 13f). El resto de las cepas que faltaron por mencionar, produjeron generalmente tres formas de microconidios: oval, elíptico o reniforme; de tamaño variable y en ocasiones con un septo, los cuales se asemejan a las especies *F. oxysporum* o *F. redolens* (Figura 13g y 13h).

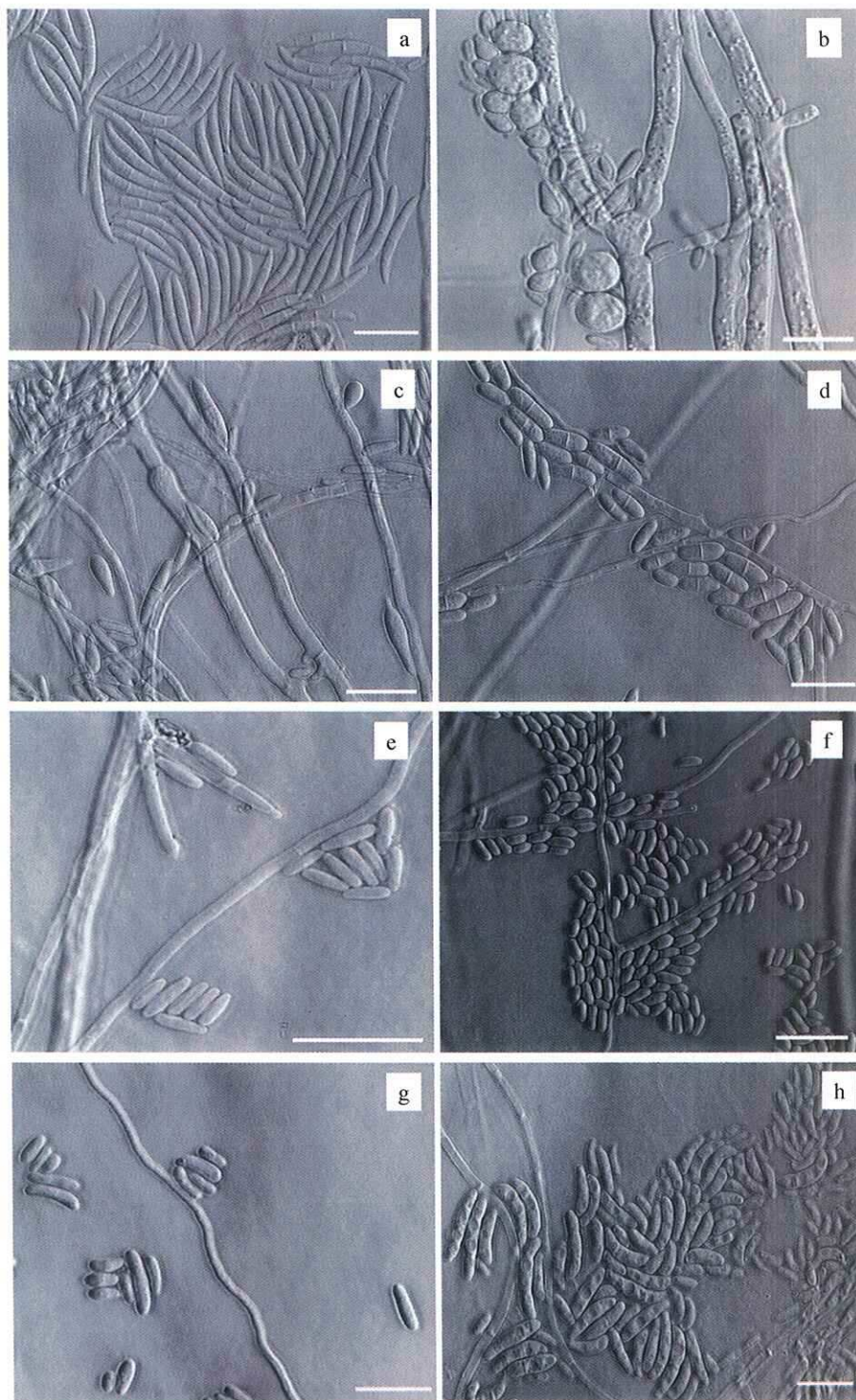


Figura 13. Microconidios del género *Fusarium* en medio SNA. a) FRO13bT, b) FTW12C, c) FRO13cT, d) FRO8C, e) FTW7T, f) FTO9C, g) FTO5aC, h) FTW13C. Barra de escala 10µm.

3.3.3. Células conidiogénicas

La célula de la cual nacen los macro y microconidios se observó claramente en los medios CLA y SNA. Las cepas se pudieron agrupar por el tipo de fiálides y la forma en cómo se produjeron los conidios sobre éstas. El primer grupo se distinguió porque sólo produjo monofiálides y falsas cabezas (Figura 14). Dentro de este grupo se encontraron cepas que presentaron diferencias principalmente en el tamaño de las monofiálides. Las especies *F. oxysporum* y *F. solani* producen este tipo de estructuras y el tamaño es una cualidad que las distingue. *F. solani* produce monofiálides bastante largas y *F. oxysporum* presenta monofiálides cortas o medianas y ambas especies producen falsas cabezas. Las cepas FPA2C, FPA4aC, FRO1C, FRO2aC, FRO5C, FRO8C, FRO9C y FRO1T produjeron monofiálides largas, mientras que el tipo de monofiálides cortas destacó en la mayoría de las cepas.

El segundo grupo produjo mono y polifiálides, de tamaño cualitativamente mediano (Figuras 15a y 15c) y pequeño (Figuras 15e y 15f). Los microconidios en las cepas FTW12C, FTW7T, FTW8T, FTW13T, FTO1C, FTO4C, FRO4C, FRO7C y FRO4T, surgieron de las fiálides formando cadenas cortas (Figuras 15b y 15d). La cepa FTW12C se distinguió del resto porque las ramificaciones en las polifiálides fue mucho mayor (Figura 15c). La formación de microconidios en cadenas cortas, es una característica morfológica de identificación muy importante, en varias especies del género *Fusarium*, tales como *F. proliferatum* y *F. globosum*.

Otro tipo de mono y polifiálides se observó en las cepas FTW11C, FTO5bC, FRO6T, FRO13bC y FRO13bT las cuales fueron mucho más pequeñas. La forma de estas se puede observar en las Figuras 15e y 15f. Estas fiálides se asemejan bastante a las producidas por la especie *F. semitectum*.

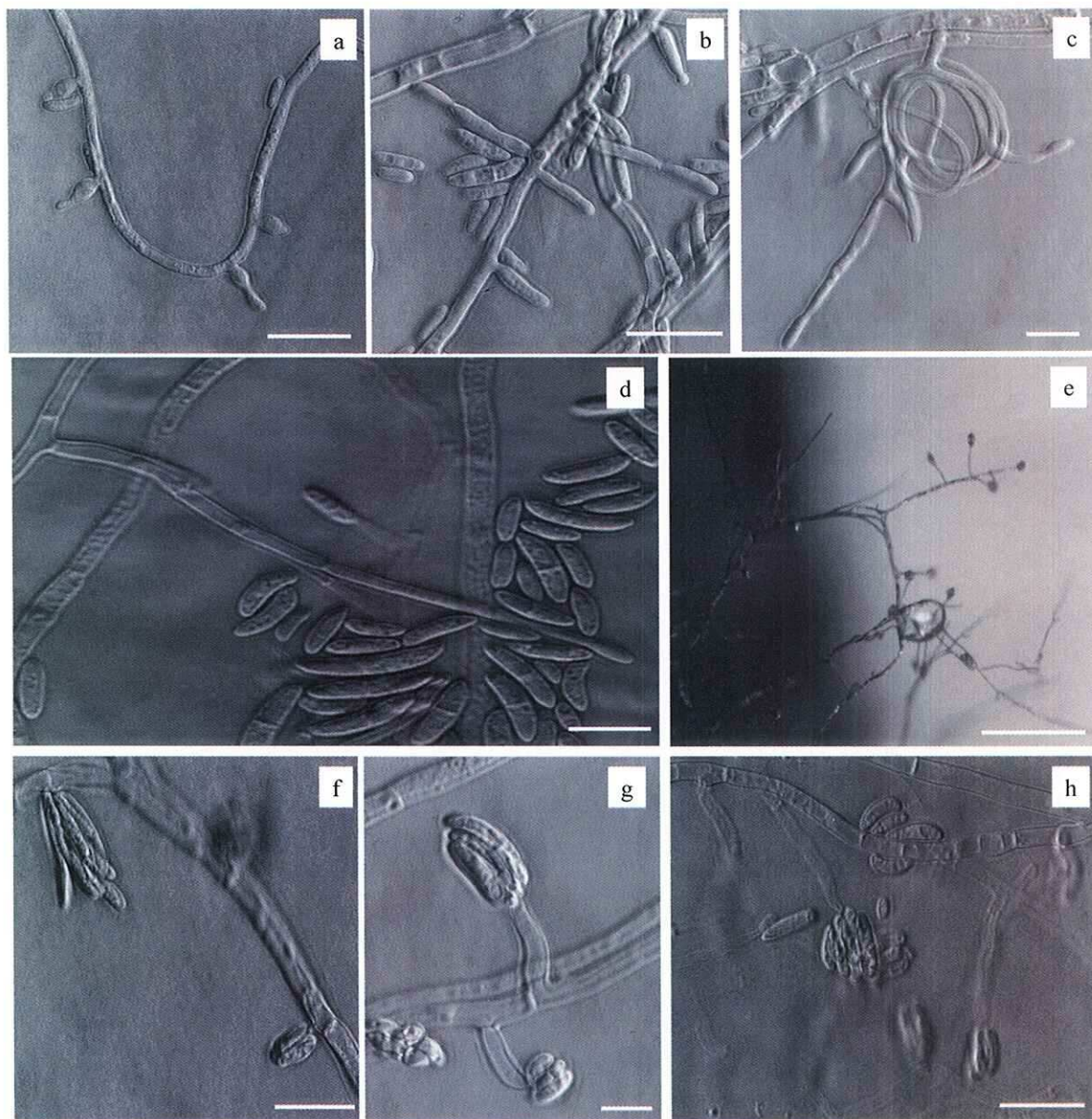


Figura 14. Monofíalides y falsas cabezas producidas en medio SNA. Monofíalides cortas: a) FTO3C, b) FRO2bT, c) FTW6C. Monofíalides largas: d y e) FRO8C. Falsas cabezas: f) FTO5T, g) FTW6C, h) FRO8C. Barra de escala a-d y f-h) 10 μ m, d) 200 μ m.

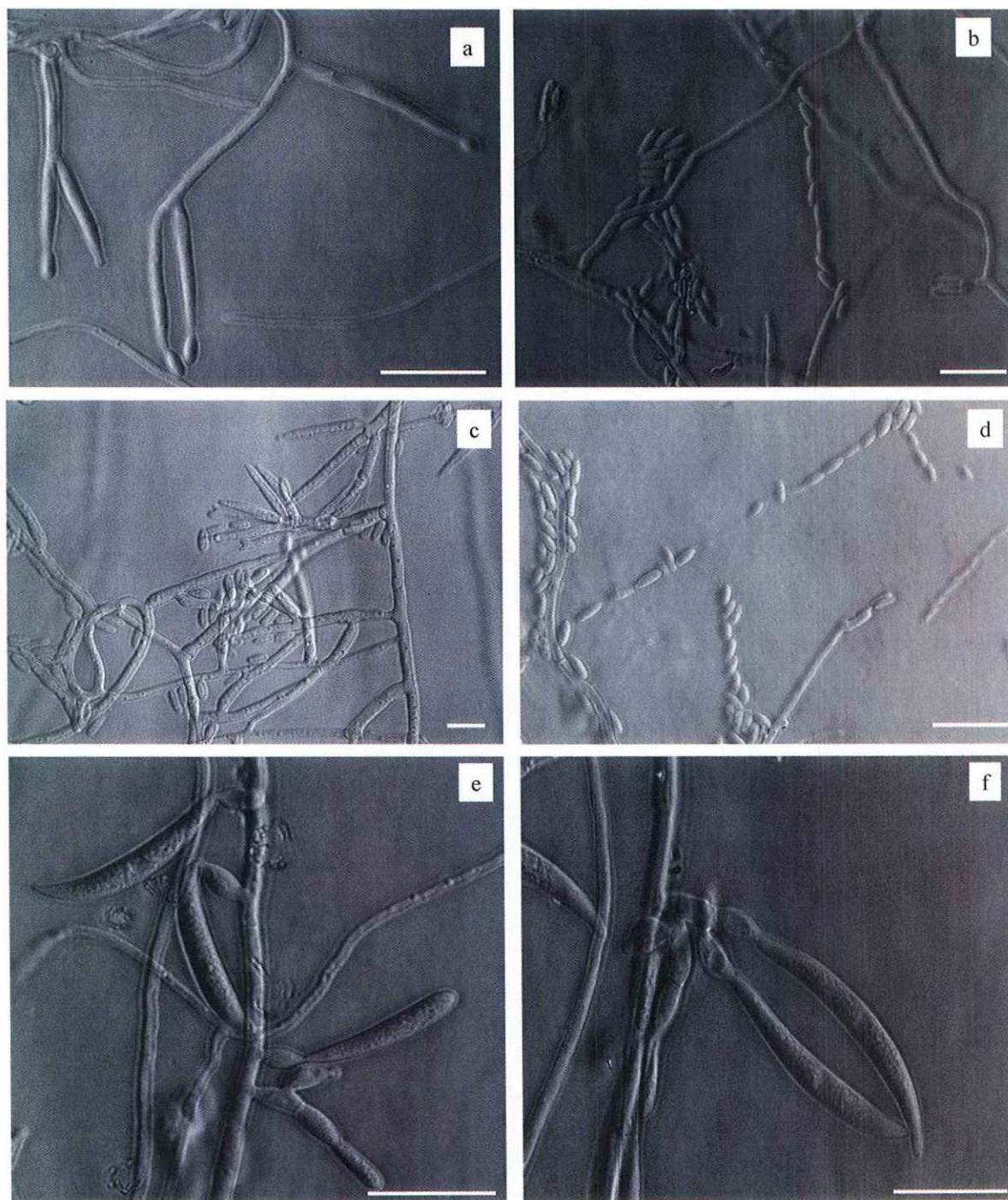


Figura 15. Células conidiogénicas producidas en medio SNA. a-d) microconidios, e-f) macroconidios. a y b) FRO7C, c y d) FTW12C, e y f) FRO6T. Barra de escala 10 μ m.

El tercer grupo produjo polifiálides bastante largas con un patrón de ramificación muy similar entre ellos, tal como se muestra en las imágenes de las Figuras 16a, 16b y 16c, las cuales corresponden a las cepas FPA1T, FTO1T y FTO9C respectivamente, que fueron las únicas que presentaron este tipo de estructuras.

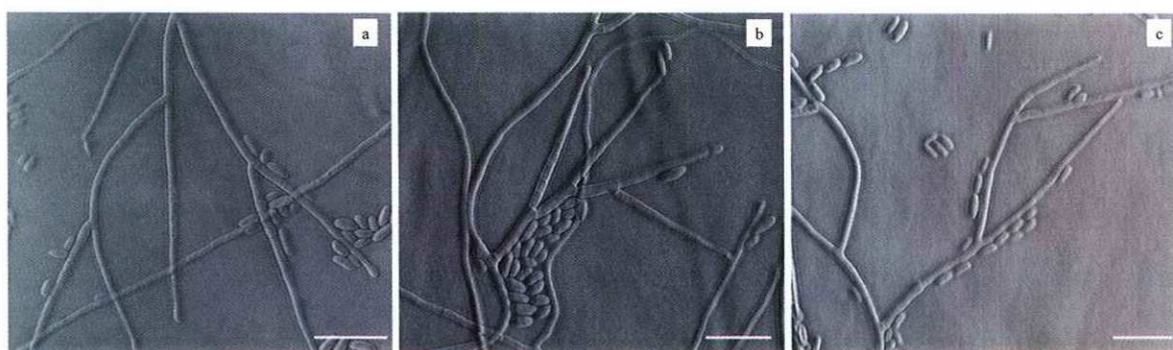


Figura 16. Polifiálides producidas en medio SNA. a) FPA1T, b) FTO1T, c) FTO9C. Escala 10µm.

3.3.4. Clamidosporas

La producción de clamidosporas se analizó cuando las cepas tenían aproximadamente una o dos semanas en cultivo; en este período de tiempo sólo algunas cepas formaron este tipo de esporas. Las clamidosporas que produjeron las cepas FPA2C, FPA4aC, FRO1C, FRO2aC, FRO5C, FRO8C, FRO9C y FRO1T se formaron de manera individual (Figura 17a), en parejas (Figura 17b), en cadenas cortas (Figura 17c) o se observó una combinación de todas (Figuras 17f), las cuales son muy características de *F. solani*. Por otro lado, las clamidosporas que produjeron las cepas FTW11C, FTO5bC, FRO6T, FRO13bC y FRO13bT tuvieron aspecto rugoso y se formaron principalmente en cadenas (Figura 17d) o en grupos (Figura 17e), como aquellas que produce *F. semitectum*. La mayoría de las cepas que presentaron monofiálides cortas, produjeron clamidosporas individuales (Figura 17g), terminales o intercaladas en el micelio con aspecto liso, como las que suele producir *F. oxysporum*.

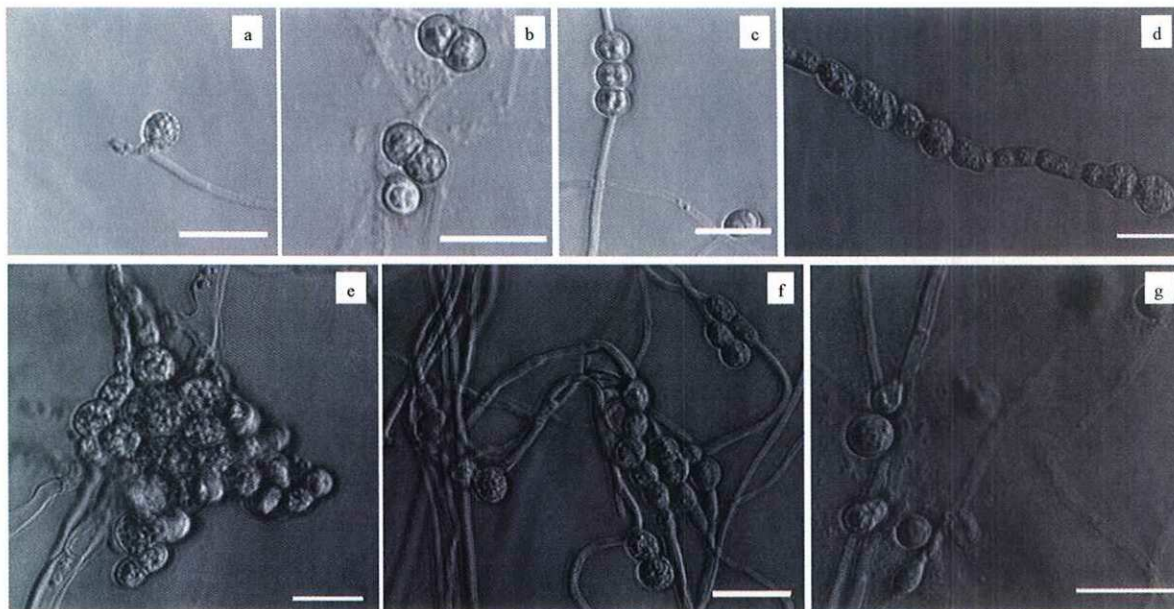


Figura 17. Clamidosporas en medio CLA. a, b, c) FPA2C, d y e) FTO5bC, f) FTW13C, g) FRO13bT. Barra de escala 10µm.

3.3.5. Formación de hifas estériles

Otra característica de diagnóstico en algunas especies del género *Fusarium* es la formación de hifas estériles enrolladas (Leslie et al., 2006). Las cepas FTW8T, FTW13, FPA4aC, FTO11T, FRO1C y FRO11C produjeron este tipo de hifas en medio de cultivo SNA, como se muestra en las imágenes de la Figura 18; en medio CLA no se observaron.

4. Identificación de especies del género *Fusarium*

En la tabla VI, se resumen las características morfológicas generales que presentaron las cepas bajo estudio y la especie del género *Fusarium* a la cual correspondieron dichas características, de acuerdo a lo descrito por Leslie et al., 2006.

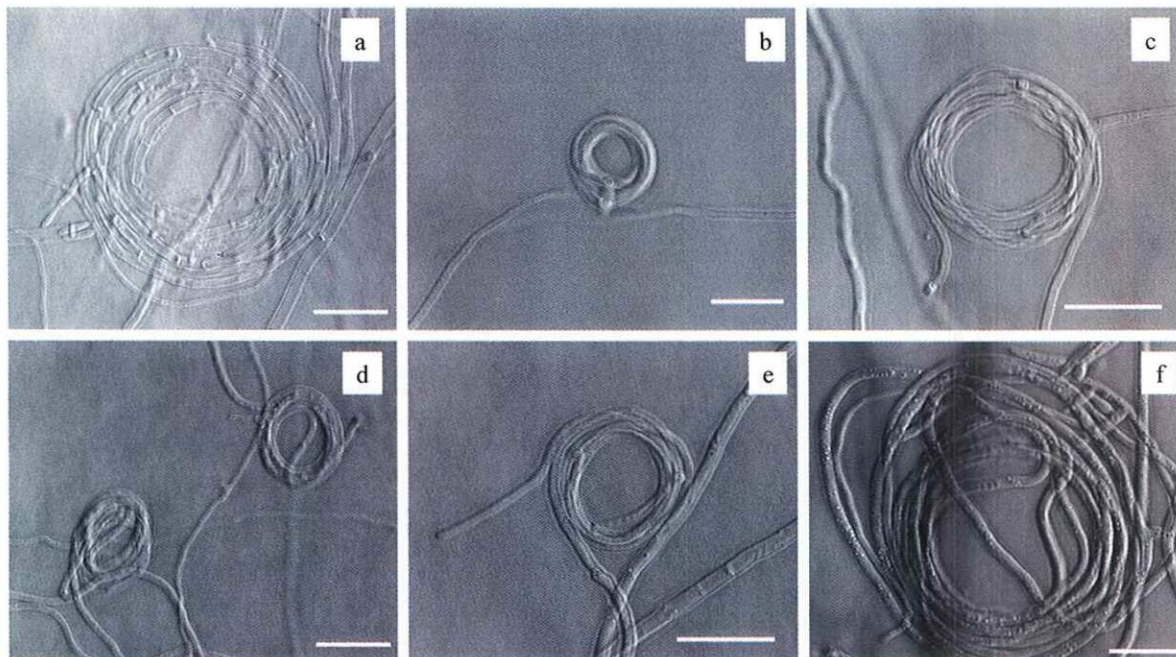


Figura 18. Hifas estériles producidas en medio SNA. a) FTW8T, b) FTW13T, c) FPA4aC, d) FTO11T, e) FRO1C, f) FRO11C. Barra de escala 10µm.

4.1 Especies del género *Fusarium* identificadas por sitio de muestreo

Bajo el concepto de especie morfológica, las cepas aisladas de la corona y del tallo de los diferentes cultivares de clavel se identificaron y agruparon dentro de ocho especies del género *Fusarium*.

En el rancho Twins, se identificaron cuatro especies: *F. redolens*, *F. semitectum*, *F. proliferatum* y *F. globosum*. En la tabla VII, se muestran los cultivares y el tipo de tejido de los cuales fueron aisladas. Las especies *F. redolens* y *F. proliferatum* fueron las más comunes, la primera se recuperó sólo de la corona y la segunda sólo del tallo. Las especies *F. semitectum* y *F. globosum* se identificaron sólo en un cultivar cada una.

Tabla VI. Características morfológicas de cepas de *Fusarium* spp. aisladas de plantas de clavel.

Micelio	Pigmentación		Esp.	Escl.	Macroconidios		Microconidios		Célula contigüenica			Clamidoporas		Especie (Leslie et al., 2006)
	Adv.	Rev.			F	S	F	S	Mono	Poli	FC	CC	A	T
Flo esc abu	vio	vio	-	neg vio azu	del rec cur	3	ov el re	0-1	•	-	•		li	ind par
Pla	bco- ros	mar	cre	-	gan	3-4	ov ci	0-2	•	-	•		ru	cad ter int
Abu	bco- pur vio	vio	nar- pa	neg azu	del rec	3-5	cl-tr pi	0	•	•	•	•	-	<i>F. proliferatum</i>
Abu	bco- vio	vio	-	-	del rec cur	-	cl-tr na glo		•	•	•	•	-	<i>F. globosum</i>
Esc	bco- cre	vio mar	cre	-	rob	5	ov el	0-2	••	-			li ru	int ter ind par
Abu Den	bco- bei	mm	-	-	cur-do rec-ve	3-5	pi ov me	1 3-5	•	•			li	ind cad
Abu Den	roj	roj	-	-	del gan	3	na ov pi	0-1	•	-	•		li	ind par
Abu Den	ama	ama	nar- in	-	-	-	ov	0	••	••	-	-		<i>Fusarium</i> sp.

Micelio: al=algodonoso, flo=flooso, pla=plano, esc=escaso, abu=abundante, den=denso.

Pigmentación: pur=púrpura, vio=violeta, ros=rosa, cre=crema, bco=blanco, mar=marrón, ama=amarillo, roj=rojo, mm=manchas marrón.

Esp=Esporodocios: cre=crema, nar-pa=naranja palido, nar-in=naranja intenso

Escl=Esclerocios, neg=negros, vio=violeta,azu=azul.

Macroconidios: del=delgados, rob=robustos, rec=rectos, cur=curvados, cur-do=curvatura dorsal, rec-ve= rectos en la parte ventral, gan=forma de gancho.

Microconidios: cl tr= clavados con base trunca, ov=oval, na=napiiformes, gl=globosos, re=reniformes, el=elipsoide, fu=fusiiforme, ci=cilindricos.

Célula contigüenica: mono=monofálides, poli= polifálides, FC= falsas cabezas, CC= cadenas cortas

Clamidoporas: li=lisa, ru=rugosa, ind=individual, par= parejas, gru=grupos, cad=cadenas, int= intercalares,

••= mono/polifálides cortas o medianas

•••= monofálides/polifálides muy largas

Tabla VII. Cepas de *Fusarium* spp. identificadas bajo el concepto de especie morfológica, correspondientes al rancho Twins.

Rancho Twins							
Tejido	Cultivar	Cepa	Especie				Resistencia ¹
			<i>F. redolens</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. semitectum</i>	<i>F. globosum</i>	
C O R O N A	Capri	FTW5C	•				RRR
	W. Fleurette	FTW6C	•				RR
	Delphi	FTW10C	•				RR
	Vega	FTW11C			•		RRR
	Mixto	FTW12C				•	*
	Chateau	FTW13C	•				RRR
T A L L O	Fleurette	FTW7T		•			RR
	Euforia	FTW8T		•			RRR
	Chateau	FTW13T		•			RRR

¹= Resistencia a la raza 2 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (HilverdaKooij Plant Technology, catálogo 2009-2010). Donde R= poco resistente, RR= moderadamente resistente, RRR= resistente, *= Desconocida.

En el rancho Pacífico, fueron identificadas las especies: *F. oxysporum*, *F. redolens*, *F. solani* y *Fusarium* sp. en el cultivar Nelson. En la tabla VIII, se muestran las cepas y tipo de tejido correspondientes a cada especie identificada. La especie *F. oxysporum* sólo se identificó en el tallo de una planta. La especie *F. redolens* fue la más común y se identificó tanto en la corona como en el tallo de diferentes plantas. *F. solani* sólo se identificó en la corona de dos plantas. La cepa FPA1T morfológicamente sólo se identificó a nivel de género.

Tabla VIII. Cepas de *Fusarium* spp. identificadas bajo el concepto de especie morfológica, correspondientes al rancho Pacífico.

Rancho Pacifico								
Tejido	Clavel (cultivar)	Cepa	Especie				Resistencia ¹	
			<i>F. oxysporum</i>	<i>F. redolens</i>	<i>F. solani</i>	<i>Fusarium</i> sp.		
C O R O N A	Nelson	FPA2C			•		RRR	
		FPA3C		•				
		FPA4aC			•			
		FPA4bc		•				
T A L L O		FPA1T				•		
		FPA2T		•				
		FPA3T	•					
		FPA4aT		•				
		FPA4bT		•				

¹= Resistencia a la raza 2 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (HilverdaKooij Plant Technology, catálogo 2009-2010). Donde R= poco resistente, RR= moderadamente resistente, RRR= resistente.

En el rancho El Toro, fueron identificadas cinco especies: *F. oxysporum*, *F. redolens*, *F. proliferatum*, *F. semitectum* y *Fusarium* sp. En la tabla IX, se muestran los cultivares y tipo de tejido de los cuales fueron aisladas. La especie más común fue *F. oxysporum*, la cual se identificó tanto en la corona como en el tallo de la mayoría de los cultivares. La especie *F. redolens* se identificó en la corona de tres cultivares y sólo en el tallo de uno de ellos. *F. proliferatum* únicamente se identificó en la corona de los cultivares Nelson y Pink Nelson. El cultivar Bright Rendez Vous fue el único en el que se identificaron dos especies en una misma muestra y tipo de tejido. Las cepas FTO9C y FTO1T sólo se identificaron a nivel de género.

Tabla IX. Cepas de *Fusarium* spp. identificadas bajo el concepto de especie morfológica, correspondientes al rancho El Toro.

Rancho El Toro								
Tejido	Clavel cv.	Cepa	Especie					Resistencia
			<i>F. oxysporum</i>	<i>F. redolens</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. semitectum</i>	<i>Fusarium</i> sp.	
C O R O N A	Nelson	FTO1C			•			RRR
		FTO7C	•					
	Raggio di sole	FTO2C		•				R
	Vesuvio	FTO3C		•				R
		FTO9C					•	
	Pink Nelson	FTO4C			•			RRR
	Bright Rendez Vous	FTO5aC		•				RRR
		FTO5bc				•		
		FTO11C	•					
	Delphi	FTO6C	•					RR
T A L L O	Nelson	FTO1T					•	RRR
		FTO7T	•					
	Vesuvio	FTO3T	•					R
	Pink Nelson	FTO4T	•					RRR
	Bright Rendez Vous	FTO5T		•				RRR
		FTO11T	•					
	Raggio di sole	FTO8T	•					R

¹= Resistencia a la raza 2 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (HilverdaKooij Plant Technology, catálogo 2009-2010). Donde R= poco resistente, RR= moderadamente resistente, RRR= resistente.

En el rancho La Rosalera se identificaron las siguientes especies: *F. oxysporum*, *F. redolens*, *F. solani*, *F. proliferatum*, *F. semitectum* y *F. tricinctum*. En la tabla X, se muestran los cultivares y tipo de tejido de los cuales fueron aisladas. De estas especies, *F. oxysporum* fue la más frecuente ya que se identificó en 10 de los 13 cultivares muestreados. En el cultivar Pink Nelson se recuperaron dos cepas morfológicamente diferentes de una misma planta tanto en la corona como en el tallo. Los aislados del tallo se identificaron como *F. redolens* y *F. solani*, y los de la corona como *F. oxysporum*. El cultivar Delphi, fue el único en el que se identificaron tres especies dentro de una misma planta, *F. semitectum* y *F. tricinctum* tanto en la corona como en el tallo y *F. oxysporum* únicamente en la corona.

Tabla X. Cepas de *Fusarium* spp. identificadas bajo el concepto de especie morfológica, correspondientes al rancho La Rosalera.

Rancho La Rosalera									
Tejido	Clavel (cultivar)	Cepa	Especie						Resistencia ¹
			<i>F. oxysporum</i>	<i>F. redolens</i>	<i>F. solani</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. semitectum</i>	<i>F. tricinctum</i>	
C O R O N A	Cherry Tessino	FRO1C			•				RR
	Pink Nelson	FRO2aC			•				RRR
		FRO2bC		•					
	Mini	FRO3C	•						*
	Arebalo	FRO4C				•			R
	Lion King	FRO5C			•				R
	Tabor	FRO6C	•						RRR
		FRO9C	•						
	Mini blanca	FRO7C				•			
	Rendez Vous	FRO8C			•				RRR
	Fushia	FRO10C		•					*
	Tia Maria	FRO11C	•						RR
	Mini roja	FRO12C	•						*
	Delphi	FRO13bC					•		RR
		FRO13cC						•	
	Rosita	FRO14C	•						*
T A L L O	Cherry Tessino	FRO1T			•				RR
	Pink Nelson	FRO2aT	•						RRR
		FRO2bT	•						
	Mini	FRO3T					•		*
	Arebalo	FRO4T				•			R
	Tabor	FRO6T	•						RRR
		FRO9T	•						
	Mini blanca	FRO7T	•						*
	Rendez Vous	FRO8T	•						RRR
	Fushia	FRO10T	•						*
	Delphi	FRO13aT	•						RR
		FRO13bT					•		
		FRO13cT						•	

¹= Resistencia a la raza 2 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (HilverdaKooij Plant Technology, catálogo 2009-2010). Donde R= poco resistente, RR= moderadamente resistente, RRR= resistente, *= Desconocida.

5. Caracterización molecular

5.1 Amplificación de la región ITS

La amplificación de la región ITS1-5.8S-ITS2 por PCR utilizando los oligonucleótidos universales ITS1 e ITS4, generó fragmentos de 550 a 570 pb aproximadamente, en las cepas del género *Fusarium* analizadas. Estos fragmentos correspondieron al tamaño esperado para este género. En la figura 19 se muestran las ligeras variaciones en el tamaño de los fragmentos obtenidos de diferentes cepas.

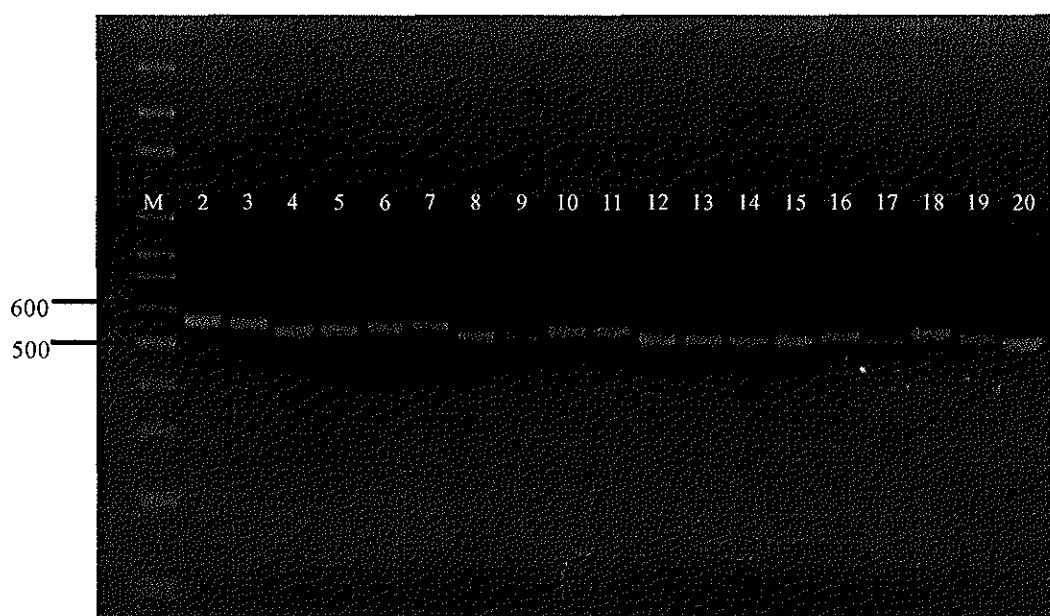


Figura 19. Ejemplo de un gel de agarosa (2.5%) mostrando fragmentos de la región ITS (ITS1-5.8S-ITS2) amplificados por PCR con los oligonucleótidos ITS1 e ITS4. 1) FRO1C, 2) FRO2aC, 3) FRO2bC, 4) FRO3C, 5) FRO4C, 6) FRO5C, 7) FRO6C, 8) FRO7C, 9) FRO8C, 10) FRO9C, 11) FRO10C, 12) FRO11C, 13) FRO12C, 14) FRO13bC, 15) FRO13cC, 16) FRO14C, 17) FRO1T, 18) FRO2aT, 19) FRO2bT. M= marcador de peso molecular (100 pb, Labnet International, Inc.).

5.2 Análisis RFLP

La digestión de la región ITS1-5.8S-ITS2 con las enzimas *MspI* y *SmaI* realizada en las cepas de *Fusarium* spp. dió como resultado, cuatro patrones de bandas con *MspI* y dos con *SmaI*. En la tabla XI se muestran los datos correspondientes al tamaño de los fragmentos de

restricción obtenidos en cada una de las cepas, los cuales coincidieron con los fragmentos reportados por Lee et al. (2000) y Chehri et al. (2011), para las especies *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. solani*, *F. semitectum* y *F. equiseti*.

Tabla XI. Fragmentos de restricción obtenidos de la región ITS1-5.8S-ITS2 de cepas de *Fusarium* spp.

Patrón de bandas (pares de bases)		Rancho				Figura	Especie (Lee et al., 2000; Chehri et al., 2011)
<i>MspI</i>	<i>SmaI</i>	Twins	Pacífico	El Toro	La Rosalera		
100, 450	550	FTW5C FTW6C FTW10C FTW13C	FPA3C FPA2T FPA3T FPA4aT FPA4bT	FTO2C FTO3C FTO5aC FTO6C FTO7C FTO9C FTO11C FTO3T FTO4T FTO5T FTO7T FTO8T	FRO2bC FRO3C FRO6C FRO10C FRO11C FRO12C FRO14C FRO2aT FRO2bT FRO7T FRO8T FRO9T FRO10T	20	<i>F. oxysporum</i>
100, 180, 250	230, 350	FTW7T FTW8T FTW13T	FPA4bC	FTO1C FTO4C	FRO4C FRO7C FRO13cC FRO4T	21	<i>F. proliferatum</i>
210, 360	230, 350	FTW12C	FPA2C FPA4aC FPA1T	FTO1T	FRO1C FRO2aC FRO5C FRO8C FRO9C FRO1T FRO13cT	21	<i>F. solani</i>
550	550	FTW11C		FTO5bC FTO11T	FRO13bC FRO3T FRO6T FRO13bT	22	<i>F. semitectum</i> o <i>F. equiseti</i>

Las especies que fueron identificadas morfológicamente como *F. redolens* y *F. oxysporum*, presentaron el mismo patrón de bandas en el análisis de RFLP, como se muestra en la figura 20, por lo que este análisis no permitió diferenciarlas. En el carril número 11 de esta misma figura, se encuentra la cepa FTO9C, la cual, morfológicamente sólo se identificó a nivel de género. De acuerdo a los fragmentos del análisis de RFLP, esta cepa presentó fragmentos similares a los de la especie *F. oxysporum*. En el carril número 19 se encuentran los fragmentos generados en la cepa FRO14C, la cual fue identificada a nivel morfológico como *F. oxysporum*, sin embargo, el patrón de bandas obtenido fue diferente al reportado para esta especie observándose bandas de 250 y 300bp con la enzima *MspI* y dos bandas de 200 y 300 pb con *SmaI*.

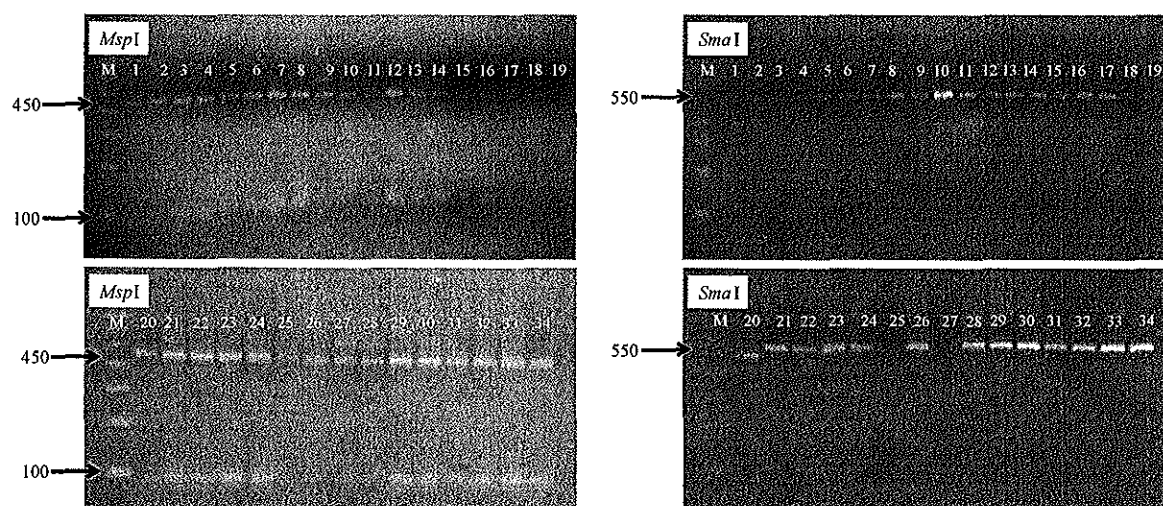


Figura 20. Gel de Agarosa mostrando la restricción de la región ITS con las endonucleasas *MspI* y *SmaI* de cepas identificadas morfológicamente como *F. redolens*: 1) FTW5C, 2) FTW6C, 3) FTW10C, 4) FTW13C, 6) FTO2C, 7) FTO3C, 8) FTO5aC, 13) FRO2bC, 16) FRO10C, 21) FPA2T, 23) FPA4aT, 24) FPA4bT, 27) FTO5T; *F. oxysporum*: 5) FPA3C, 9) FTO6C, 10) FTO7C, 11) FTO9C, 12) FTO11C, 14) FRO3C, 15) FRO6C, 17) FRO11C, 18) FRO12C, 19) FRO14C, 20) FRO2aT, 22) FPA3T, 25) FTO3T, 26) FTO4T, 28) FTO7T, 29) FTO8T, 30) FRO2bT, 31) FRO7T, 32) FRO8T, 33) FRO9T, 34) FRO10T M= marcador de peso molecular (100 pb, Labnet International, Inc.).

Las cepas identificadas morfológicamente como *F. solani* y *F. proliferatum* presentaron el patrón de bandas reportado para estas mismas especies (Lee et al., 2000 y Chehri et al., 2011), con excepción de la cepa FRO7C, la cual presentó características morfológicas propias de *F. proliferatum* pero un patrón de bandas diferente al reportado para esta especie (Figura 21, carril 17). Las cepas FPA1T, FTO1T y FTO9C, fueron identificadas morfológicamente sólo a nivel de género, las dos primeras cepas presentaron sitios de restricción similares a los reportados para *F. solani* con ambas enzimas, tal como se muestra en los carriles 22 y 23 de la Figura 21; la cepa FTO9C, a pesar de compartir similitud morfológica con las cepas FPA1T y FTO1T, presentó sitios de restricción diferentes (Figura 21, carril 13). En esta misma figura, en el carril número 12 se encuentra la cepa FTW12C, la cual fue identificada a nivel morfológico como *F. globosum*. En los trabajos de Lee et al. (2000) y Chehri et al. (2011) no se incluyeron miembros de esta especie, sin embargo, los fragmentos de restricción generados en la cepa FTW12C con la enzima *MspI* fueron similares a los reportados por estos autores para *F. solani*. Otra especie que fue identificada a nivel morfológico y que estos autores no incluyeron es sus trabajos fue *F. tricinctum*, la cual generó fragmentos de aproximadamente 200 y 300 pb con ambas enzimas de restricción, tal como se muestra en los carriles 11 y 18 de la Figura 21. Algunas cepas no se digirieron completamente con la enzima *SmaI*, probablemente esta enzima sea más sensible y exija mayor calidad en la calidad del ADN, sin embargo, a pesar de ello se logró obtener los resultados esperados.

Las cepas que fueron identificadas morfológicamente como *F. semitectum*, no presentaron sitios de restricción para las enzimas *MspI* y *SmaI*, por lo que en estas cepas se observó un único fragmento de 550pb aproximadamente, correspondiente a la región ITS, tal como se muestra en la Figura 22. Lee et al. (2000) y Chehri et al. (2011), reportaron en sus trabajos que las especies *F. semitectum* y *F. equiseti* no tienen sitios de corte con ambas enzimas.

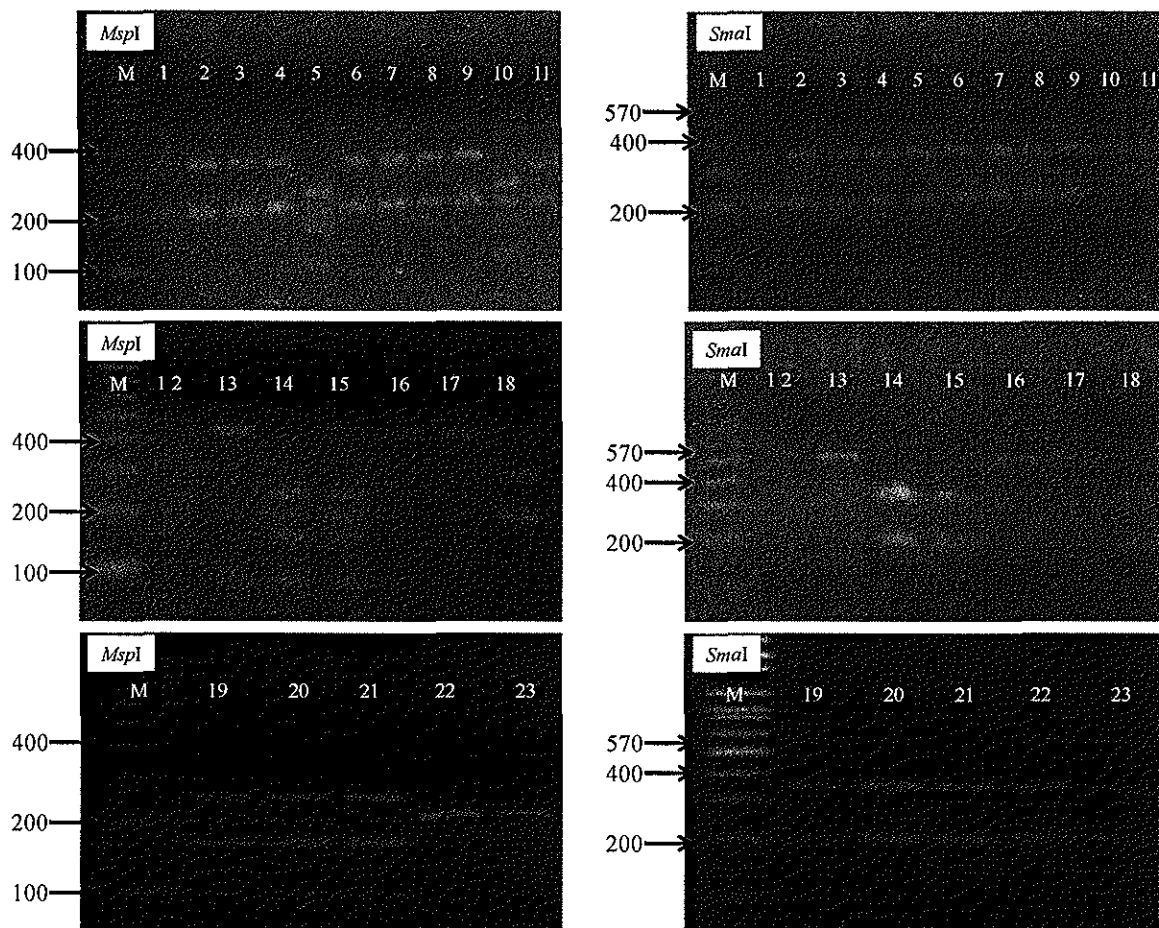


Figura 21. Análisis de restricción de la región ITS con las endonucleasas *MspI* y *SmaI* de cepas identificadas morfológicamente como *Fusarium solani*: (carriles 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 y 9, cepas FPA2C, FPA4aC, FRO1C, FRO2aC, FRO5C, FRO8C, FRO9C y FRO1T respectivamente); *Fusarium proliferatum*: (carriles: 5, 10, 14, 15, 17, 19, 20 y 21, cepas FRO4C, FRO4T, FTO1C, FTO4C, FRO7C, FTW7T, FTW8T y FTW13T respectivamente); *F. globosum*: (carril 12, cepa FTW12C); *F. tricinctum* (carriles 11 y 18 cepas FRO13cT y FRO13cC respectivamente); *Fusarium* sp. (carriles 16, 22 y 23, cepas FTO9C, FPA1T y FTO1T respectivamente); *F. oxysporum* (carril 13, cepa FPA4bC). M= marcador de peso molecular (100 pb, Labnet International, Inc.).

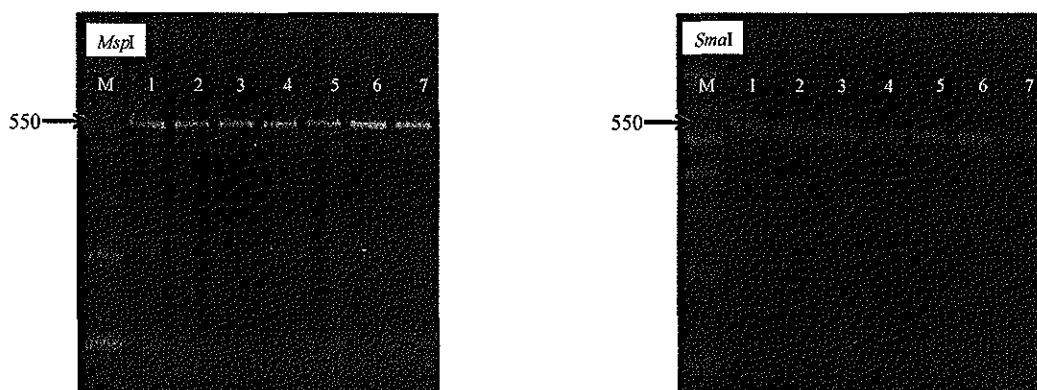


Figura 22. Restricción de la región ITS con *MspI* y *SmaI*, de cepas identificadas morfológicamente como *F. semitectum*. 1) FTW11, 2) FTO5bC, 3) FRO13bC, 4) FTO11T, 5) FRO3T, 6) FRO6T, 7) FRO13bT. M= marcador de peso molecular (100 pb, Labnet International, Inc.).

5.3. Análisis de secuencias del factor de elongación de la traducción EF1 α

La amplificación del EF1 α utilizando los oligonucleótidos universales EF1-728 y EF2 generó como resultado un fragmento con tamaño aproximado de 500pb. Aunque se manejaron las mismas condiciones para todas las cepas, la amplificación de este fragmento únicamente se logró en 39 de ellas.

Cuando se compararon las secuencias obtenidas con las documentadas para *Fusarium* spp. en la base de datos del NCBI y FUSARIUM-ID, las cepas mostraron alto porcentaje de identidad con algunas especies aquí presentes, tal como se muestra en la Tabla XII. De las treinta y nueve cepas analizadas, la mayoría (veintisiete en total) presentaron identidad con la especie *F. oxysporum* y algunas subespecies. Así, dieciséis de ellas mostraron identidad con la especie *F. oxysporum*; ocho con *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*; dos con *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*; una con *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*; cinco con *F. proliferatum* o su teleomorfo; tres con *F. solani*, dos con el complejo de especies *F. incarnatum-equiseti*; una con *F. equiseti* y una con *F. tricinctum*.

Las cepas FTW13C, FPA4aT, FPA4bT, FTO2C, FTO3C, FTO5aC, FTO5T y FRO10C fueron identificadas morfológicamente como *F. redolens*, sin embargo, el análisis de secuencias muestra que estas cepas presentan un alto porcentaje de identidad con la especie

F. oxysporum y sus distintas formas especiales, principalmente *F. oxysporum* f. sp *dianthi*. Las dieciocho cepas restantes que presentaron identidad con esta especie, coinciden con la identificación morfológica y el análisis RFLP.

El análisis de secuencias de las cepas que presentaron alto porcentaje de identidad con la especie *F. proliferatum*, coincidió con la identificación morfológica y el análisis RFLP.

La cepa FTO1T presentó 100% de identidad con la cepa NRRL 22585 de *F. solani*. Morfológicamente FTO1T sólo se identificó a nivel de género, sin embargo, en el análisis RFLP presentó un patrón de bandas correspondiente a *F. solani*, por lo que ambos análisis moleculares coincidieron.

Con el análisis de secuencias, las cepas FTW11C y FRO13bT presentaron mayor porcentaje de identidad con el complejo de especies *F. incarnatum-equiseti* y la cepa FR13bC con *F. equiseti*. Estas cepas morfológicamente habían sido identificadas como *F. semitectum* (sinónimo de *F. incarnatum*).

Las cepas FRO13cC y FRO13cT fueron identificadas morfológicamente como *F. tricinatum*. En el análisis de secuencias la primera cepa presentó un porcentaje de identidad con *F. tricinatum* cercano al 100%, lo cual indica que esta cepa corresponde a esta especie. La segunda cepa quedó pendiente de secuenciar.

En las tablas XIII y XIV se presentan las cepas identificadas bajo el concepto morfológico y el concepto filogenético.

Tabla XII. Comparación de secuencias de *Fusarium* spp. obtenidas en este estudio con secuencias documentadas en el NCBI, correspondientes al gen del factor de elongación de la traducción 1a.

No.	CEPA	No. de acceso	Descripción	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
1	FTW10C	JF740817.1	<i>Fusarium oxysporum</i> strain NRRL 52741 translation elongation factor alpha gene, partial cds	<u>905</u>	905	95%	0.0	100%
2	FPA4bC	JQ029739.1	<i>Fusarium oxysporum</i> isolate 08YS/G-1 translation elongation factor 1 alpha (EF-1alpha) gene, partial cds	<u>158</u>	158	87%	1e-35	90%
3	FT02C	JF740817.1	<i>Fusarium oxysporum</i> strain NRRL 52741 translation elongation factor alpha gene, partial cds	<u>907</u>	1191	99%	0.0	100%
4	FT05aC	JF740817.1	<i>Fusarium oxysporum</i> strain NRRL 52741 translation elongation factor alpha gene, partial cds	<u>894</u>	894	100%	0.0	100%
5	FT06C	HQ731057.1	<i>Fusarium oxysporum</i> isolate 808 translation elongation factor alpha (TEF-1 alpha) gene, partial sequence	<u>684</u>	684	88%	0.0	96%
6	FT07C	JF740817.1	<i>Fusarium oxysporum</i> strain NRRL 52741 translation elongation factor alpha gene, partial cds	<u>883</u>	883	99%	0.0	100%
7	FT09C	HQ731057.1	<i>Fusarium oxysporum</i> isolate 808 translation elongation factor alpha (TEF-1 alpha) gene, partial sequence	<u>891</u>	891	100%	0.0	99%
8	FT03T	JF740878.1	<i>Fusarium oxysporum</i> strain NRRL 52937 translation elongation factor alpha gene, partial cds	<u>907</u>	907	100%	0.0	100%
9	FT04T	JF740878.1	<i>Fusarium oxysporum</i> strain NRRL 52937 translation elongation factor alpha gene, partial cds	<u>907</u>	1293	100%	0.0	100%
10	FT05T	JF740817.1	<i>Fusarium oxysporum</i> strain NRRL 52741 translation elongation factor alpha gene, partial cds	<u>907</u>	907	100%	0.0	100%
11	FT08T	EU313532.1	<i>Fusarium oxysporum</i> isolate Fo062 translation elongation factor 1 alpha gene, partial cds	<u>889</u>	889	99%	0.0	100%
12	FR010C	JF740817.1	<i>Fusarium oxysporum</i> strain NRRL 52741 translation elongation factor alpha gene, partial cds	<u>885</u>	885	97%	0.0	99%
13	FR014C	JF740805.1	<i>Fusarium oxysporum</i> strain NRRL 52724 translation elongation factor alpha gene, partial cds	<u>839</u>	839	98%	0.0	97%
14	FR02bT	JN222900.1	<i>Fusarium oxysporum</i> isolate MIAE00140 translation elongation factor 1 alpha (tef1alpha) gene, partial sequence	<u>817</u>	817	97%	0.0	99%
15	FR03T	AF433268.1	<i>Fusarium oxysporum</i> isolate 322 elongation factor 1 alpha gene, partial cds	<u>318</u>	318	88%	2e-83	81%

Tabla XIII. Comparación de secuencias de *Fusarium* spp. obtenidas en este estudio con secuencias documentadas en el NCBI, correspondientes al gen del factor de elongación de la traducción 1a (Continuación)

No.	CEPA	No. de acceso	Descripción	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
16	FRO10T	<u>HM852046.1</u>	<i>Fusarium cf. oxysporum</i> CS-2011 strain B8660 translation elongation factor 1a (EF-1a) gene, partial cds	<u>826</u>	826	98%	0.0	99%
17	FTO11T	<u>GU226828.1</u>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i> isolate C9-10 translation elongation factor 1-alpha (EF1-alpha) gene, partial cds	<u>619</u>	619	71%	5e-174	99%
18	FTW13C	<u>GU199333.1</u>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i> isolate C6-15 translation elongation factor 1-alpha (EF1-alpha) gene, partial cds	<u>508</u>	508	88%	1e-140	89%
19	FPA3C	<u>GU226828.1</u>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i> isolate C9-10 translation elongation factor 1-alpha (EF1-alpha) gene, partial cds	<u>484</u>	484	70%	2e-133	95%
20	FPA4aT	<u>GU226828.1</u>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i> isolate C9-10 translation elongation factor 1-alpha (EF1-alpha) gene, partial cds	<u>401</u>	401	69%	2e-108	90%
21	FT03C	<u>AF246842.1</u>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i> strain NRRL26965 translation elongation factor EF1 alpha gene, partial cds	<u>431</u>	431	97%	2e-117	92%
22	FRO3C	<u>GU226828.1</u>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i> isolate C9-10 translation elongation factor 1-alpha (EF1-alpha) gene, partial cds	<u>547</u>	547	94%	2e-152	92%
23	FTO11C	<u>GU226824.1</u>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i> isolate C6-25 translation elongation factor 1-alpha (EF1-alpha) gene, partial cds	<u>889</u>	889	100%	0.0	100%
24	FRO6T	<u>GU226828.1</u>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i> isolate C9-10 translation elongation factor 1-alpha (EF1-alpha) gene, partial cds	<u>590</u>	590	91%	4e-165	93%
25	FPA4bT	<u>GQ425225.1</u>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vanillae</i> translation elongation factor 1 alpha (EF1 alpha) gene, partial cds	<u>811</u>	811	96%	0.0	99%
26	FRO9T	<u>GQ425225.1</u>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vanillae</i> translation elongation factor 1 alpha (EF1 alpha) gene, partial cds	<u>784</u>	784	97%	0.0	98%

Tabla XIV. Comparación de secuencias de *Fusarium* spp. obtenidas en este estudio con secuencias documentadas en el NCBI, correspondientes al gen del factor de elongación de la traducción 1a. (Continuación)

No.	CEPA	No. de acceso	Descripción	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
27	FR012C	AF346503.1	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> translation elongation factor 1 alpha gene, partial cds	<u>340</u>	340	61%	4e-90	87%
28	FTW7T	GU377297.1	<i>Fusarium proliferatum</i> translation elongation factor 1-alpha gene, partial sequence	<u>115</u>	115	36%	1e-22	96%
29	FTW8T	GU377297.1	<i>Fusarium proliferatum</i> translation elongation factor 1-alpha gene, partial sequence	<u>660</u>	660	94%	0.0	94%
		AM404115.1	<i>Gibberella fujikuroi</i> var. <i>intermedia</i> partial tef-1 gene for elongation factor 1-alpha, exons 1-4, isolate Gf37	<u>660</u>	660	94%	0.0	94%
30	FTW13T	GU377297.1	<i>Fusarium proliferatum</i> translation elongation factor 1-alpha gene, partial sequence	<u>798</u>	798	96%	0.0	99%
31	FTO1C	JN090160.1	<i>Gibberella intermedia</i> translation elongation factor 1 gene, partial cds (<i>Fusarium proliferatum</i>)	<u>904</u>	904	100%	0.0	100%
32	PRO4C	HQ702592.1	<i>Gibberella intermedia</i> strain O83 translation elongation factor 1 alpha gene, partial sequence	<u>821</u>	821	97%	0.0	99%
33	FTO1T	DQ247622.1	<i>Fusarium solani</i> strain NRRL 22585 translation elongation factor 1-alpha (EF1-alpha) gene, partial cds	<u>870</u>	870	95%	0.0	100%
34	PRO2aC	HQ731056.1	<i>Fusarium solani</i> isolate cc61C translation elongation factor alpha (TEF-1 alpha) gene, partial sequence	<u>902</u>	902	100%	0.0	99%
35	PRO1T	AB294863.1	<i>Fusarium</i> sp. T4922-8-2 EF-1 alpha gene for translation elongation factor	<u>878</u>	878	98%	0.0	97%
		JF740846.1	<i>Fusarium solani</i> strain NRRL 52778 translation elongation factor alpha gene, partial cds	<u>867</u>	867	99%	0.0	97%
36	FTW11C	JF740712.1	<i>Fusarium</i> sp. NRRL 25081 translation elongation factor alpha (EF1-a) gene, partial cds * <i>Fusarium incarnatum-equiseti</i> Species Complex MLST FIESC	<u>887</u>	887	98%	0.0	99%

Tabla XV. Comparación de secuencias de *Fusarium* spp. obtenidas en este estudio con secuencias documentadas en el NCBI, correspondientes al gen del factor de elongación de la traducción 1 α .(Continuación)

No.	CEPA	No. de acceso	Descripción	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
37	FR013bT	<u>GU250570.1</u>	<i>Fusarium</i> sp. NRRL 46671 translation elongation factor 1-alpha (EF1- α) gene, partial cds * <i>Fusarium incarnatum-equiseti</i> species complex	<u>822</u>	822	97%	0.0	99%
38	FR013bC	<u>JF966238.1</u>	<i>Fusarium equiseti</i> isolate ITEM 3190 translation elongation factor EF-1 gene, partial sequence	<u>549</u>	549	86%	6e-133	92%
39	FR013cC	<u>AB674264.1</u>	<i>Fusarium tricinatum</i> EF-1alpha gene, elongation factor 1alpha, partial sequence, strain: ATCC 38183	<u>832</u>	832	96%	0.0	99%

Tabla XVI. Especies del género *Fusarium* identificadas bajo el concepto morfológico.

Cultivar	Rancho									
	Twins		Pacífico		El Toro		La Rosalera			
Capri	Corona	FTW5C	Corona	Tallo	Corona	Tallo	Corona	Tallo		
W. Fleurette	Corona	FTW6C	Corona	Tallo	Corona	Tallo	Corona	Tallo		
Delphi	Corona	FTW10C	Corona	Tallo	FTO6C		FRO13bC FRO13cC	FRO13aT FRO13bT FRO13cT		
Vega	Corona	FTW11C	Corona	Tallo						
Mixto	Corona	FTW12C	Corona	Tallo						
Chateau	Corona	FTW13C	Corona	Tallo						
Fleurette	Corona	FTW13T	Corona	Tallo						
Euforia	Corona	FTW7T	Corona	Tallo						
	Corona	FTW8T	Corona	Tallo						
Nelson	Corona		FPA2C FPA3C FPA4aC FPA4bC	FPA1T FPA2T FPA3T FPA4aT FPA4bT	FTO1C FTO7C	FTO1T FTO7T				
Raggio di sole	Corona				FTO2C	FTO8T				
Vesuvio	Corona				FTO3C FTO9C	FTO3T				
Pink Nelson	Corona				FTO4C	FTO4T	FRO2aC FRO2bC	FRO2aT FRO2bT		
Bright Rendez Vous	Corona				FTO5aC FTO5bC FTO11C	FTO5T FTO11T				
Cherry Tessino	Corona						FRO1C	FRO1T		
Mini	Corona						FRO3C	FRO3T		
Arebalo	Corona						FRO4C	FRO4T		
Lion King	Corona						FRO5C			
Tabor	Corona						FRO6C FRO9C	FRO6T FRO9T		
Mini blanca	Corona						FRO7C	FRO7T		
Rendez Vous	Corona						FRO8C	FRO8T		
Fushia	Corona						FRO10C	FRO10T		
Tia Maria	Corona						FRO11C			
Mini roja	Corona						FRO12C			
Rosita	Corona						FRO14C			

morado = *F. oxysporum*, turquesa = *F. redolens*, rosa = *F. proliferatum*, amarillo = *F. solani*, verde = *F. semitectum*, rojo = *F. tricinatum*, negro = *F. globosum*, gris = *Fusarium* sp.

Tabla XVII. Especies del género *Fusarium* identificadas bajo el concepto filogenético.

Cultivar	Rancho									
	Twins		Pacífico		El Toro		La Rosalera			
Capri	Corona	FTW5C*	Corona	Tallo	Corona	Tallo	Corona	Tallo		
W. Fleurette	Corona	FTW6C*	Corona	Tallo						
Delphi	Corona	FTW10C	Corona	Tallo	FTO6C		FRO13bC FRO13cC	FRO13aT FRO13bT FRO13cT		
Vega	Corona	FTW11C	Corona	Tallo						
Mixto	Corona	FTW12C*	Corona	Tallo						
Chateau	Corona	FTW13C	Corona	Tallo						
Fleurette	Corona	FTW13T	Corona	Tallo						
Euforia	Corona	FTW7T	Corona	Tallo						
	Corona	FTW8T	Corona	Tallo						
Nelson	Corona		FPA2C* FPA3C* FPA4aC* FPA4bC	FPA1T* FPA2T* FPA3T* FPA4aT* FPA4bT	FTO1C FTO7C	FTO1T FTO7T*				
Raggio di sole	Corona				FTO2C	FTO8T				
Vesuvio	Corona				FTO3C FTO9C	FTO3T				
Pink Nelson	Corona				FTO4C*	FTO4T	FRO2aC FRO2bC*	FRO2aT FRO2bT		
Bright Rendez Vous	Corona				FTO5aC FTO5bC FTO11C	FTO5T FTO11T				
Cherry Tessino	Corona						FRO1C*	FRO1T		
Mini	Corona						FRO3C	FRO3T		
Arebalo	Corona						FRO4C	FRO4T*		
Lion King	Corona						FRO5C*			
Tabor	Corona						FRO6C* FRO9C*	FRO6T* FRO9T		
Mini blanca	Corona						FRO7C*	FRO7T		
Rendez Vous	Corona						FRO8C*	FRO8T*		
Fushia	Corona						FRO10C	FRO10T		
Tia Maria	Corona						FRO11C*			
Mini roja	Corona						FRO12C			
Rosita	Corona						FRO14C			

morado = *F. oxysporum*, rosa = *F. proliferatum*, amarillo = *F. solani*, verde = *F. incarnatum-equiseti*, rojo = *F. tricinatum*, azul = *F. equiseti*, *pendiente de secuenciar

VIII. Discusión

En este trabajo se cumplió con el objetivo de aislar cepas del género *Fusarium* de diferentes cultivares de clavel con síntomas de marchitez vascular y pudrición basal. En los cortes transversales y longitudinales realizados en la corona y el tallo de las plantas, los síntomas más relevantes que se encontraron fueron la decoloración y la presencia de manchas color marrón en los haces vasculares, los cuales son los principales síntomas reportados para el marchitamiento vascular ocasionado por *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* (Kalck Wright et al., 1997; Andrés Ares et al., 1999; Trujillo et al., 2005; Soto Sedano et al., 2009).

Por otra parte, en algunas plantas también se observó daño en la médula, síntoma que se ha relacionado con la enfermedad de pudrición del tallo de clavel (Soto Sedano et al., 2009). Esta enfermedad se ha dividido en cuatro fases: pudrición basal, pudrición basal del tallo, pudrición de ramas y muerte descendente del tocón (el tocón es la parte del tronco que queda unido a la raíz después de la poda). Aunque la etiología de esta enfermedad no está claramente definida, se ha asociado con las especies *F. culmorum*, *F. avenaceum* y *F. graminearum*, anteriormente agrupadas dentro de la especie *F. roseum* (Kalck Wright et al., 1997). En Colombia, se reportó a *F. culmorum* como el agente causal de esta enfermedad (Soto Sedano et al., 2009) y en Victoria, Australia a *F. avenaceum* (Kalck Wright et al., 1997). La fase de muerte descendente en clavel fue reportada en 1974, en el noreste de Estados Unidos, como una de las enfermedades más recurrentes e importantes, y se relacionó con *F. graminearum* (Nelson et al., 1975). Años más tarde, en Corea también se reportó a *F. graminearum* como el agente causal de esta enfermedad (Suk Han et al., 2001). Como se mencionó antes, en este trabajo, únicamente se aisló a *F. oxysporum*. Resulta interesante que no se haya encontrado ninguna de las otras tres especies, a pesar de que algunas plantas mostraron síntomas de pudrición del tallo. De acuerdo a Leslie et al. (2006), las condiciones ambientales de esta región parecen ser adecuadas para el desarrollo de estos hongos ya que *F. culmorum* y *F. avenaceum* se distribuyen principalmente en

regiones templadas, y *F. graminearum* tiene distribución cosmopolita, por lo que es muy probable que se encuentren presentes pero que no se hayan podido aislar. Aunque existe también la posibilidad de que los síntomas observados hayan sido causados por *F. oxysporum* u otra de las especies aisladas. Para probar o descartar esto, es necesario realizar pruebas de patogenicidad. Adicionalmente para descartar la presencia de estas especies en la zona es importante hacer aislamientos de tejido expuesto a heridas mecánicas o intentar aislarlos de otras ornamentales, como lisianthus (*Eustoma grandiflorum*), en donde *F. avenaceum* ha sido reportado como agente causal de pudrición de tocones y tallos (Harbaugh y McGovern, 2000). El definir claramente la etiología de la enfermedad puede contribuir a mejorar las estrategias de control.

El análisis del patrón de restricción del ITS fue útil para determinar la variabilidad entre cepas. De acuerdo con los reportes realizados por Lee et al. (2000) y Chehri, et al. (2011), el tamaño aproximado de la región ITS para las especies *F. oxysporum*, *F. semitectum* y *F. equiseti* utilizando los oligonucleótidos ITS1/ITS4, es de 550 pb y para *F. solani* y *F. proliferatum* es de 570 pb, por lo cual en este trabajo pudieron verse ciertas diferencias en el tamaño del fragmento amplificado por PCR aún antes de realizar la restricción (Figura 19). Posteriormente, con el uso de las enzimas *MspI* y *SmaI*, se determinó la variabilidad interespecífica. Manicom y Baayen (1993), mencionaron que un patrón RFLP puede tomarse como evidencia para identificar un grupo de cepas en particular. Tomando como referencia los trabajos de Lee et al. (2000) y Chehri et al. (2011) se pudo identificar molecularmente algunas de las cepas aisladas en este estudio, la excepción fueron las cepas identificadas morfológicamente como *F. oxysporum* y *F. redolens* que presentaron los mismos sitios de restricción con las enzimas *MspI* y *SmaI*, y por lo tanto no pudieron diferenciarse con esta técnica.

Tradicionalmente, la identificación de especies en hongos se realiza a nivel morfológico. Diversos autores opinan que este método consume mucho tiempo y que no es conclusivo, ya que existen muchas especies que son morfológicamente indistinguibles y por lo tanto no se pueden identificar. En este trabajo, se demuestra que en algunos casos las características

morfológicas fueron determinantes para la identificación a nivel de especie (en 49 de 64 cepas), por lo tanto se considera conveniente usar este método junto con otros de manera complementaria.

La cepa FTW12C aislada del cultivar mixto en el rancho Twins, fue la única que presentó tres tipos de microconidios, pero los más importantes fueron los de forma globosa, los cuales dieron la pauta para identificarla como *F. globosum*. Leslie et al. (2006), mencionaron que esta especie presenta cierta similitud con *F. proliferatum*, pero la forma globosa de los microconidios es una característica que los distingue. *F. beomiforme* también presenta microconidios globosos, pero carece de polifálides y microconidios en cadenas, presentes en la cepa FTW12C, por lo tanto fue identificada como *F. globosum* bajo el concepto morfológico de especie (Lorraine et al., 2010). El análisis de secuencias del EF1 α quedó pendiente de realizar en esta cepa. *F. globosum* no ha sido asociada a clavel, pero se ha encontrado asociada a granos de maíz en el sur de África y a trigo en el sur de Japón (Rheeder et al. en 1996; Lorraine et al., 2010). Su impacto en la producción agrícola de Baja California queda por evaluarse.

Otras cepas muy distintivas fueron FRO13cC y FRO13cT aisladas de la corona y tallo del cultivar Delphi del rancho La Rosalera. Estas cepas fueron las únicas que produjeron pigmentos rojos en el adverso y reverso de la colonia en medio PDA. Esta característica facilitó su identificación al disminuir el número de especies probables. Posteriormente la forma de los microconidios napiformes, ovales y piriformes con una papila en la base, dieron la pauta para identificarlas como *F. tricinctum* (Leslie et al. 2006). En cuanto al análisis genético de RFLP, las dos cepas mostraron el mismo patrón de bandas pero el análisis de las secuencias del EF1 α sólo confirmó la identidad de FRO13cC. Aunque queda por confirmar la identidad de FRO13cT, el hecho de que muestre las mismas características morfológicas y que haya sido aislado de la misma planta que FRO13cC, indica que también pertenece a *F. tricinctum*. Esta especie fue reportada en Estados Unidos por Nelson et al. (1975) y en Australia por Kalc Wright et al. (1997) como el agente causal de la pudrición de yemas en el cultivo de clavel. En México, no existen reportes de esta especie en clavel,

por lo que se sugiere, que en estudios posteriores, se realicen pruebas de patogenicidad con estas cepas y se intente obtener aislamientos de yemas.

Las cepas de *F. solani* fueron las más fáciles de identificar por sus características morfológicas microscópicas. En cuanto a la morfología y pigmentación de la colonia, algunas cepas presentaron tonalidades color blanco a crema en el micelio y ligeramente amarillo en el reverso de la colonia, tal como las describieron Leslie et al. (2006). Aunque la cepa FRO8C, presentó micelio rosa a violeta con pigmentación completamente marrón en el agar, en las estructuras microscópicas no se observaron diferencias. Todas las cepas identificadas morfológicamente como *F. solani*, fueron confirmadas con el análisis de RFLP y el análisis del EF1 α confirmó la identidad de las 2 cepas secuenciadas.

Las cepas FPA1T, FTO1T y FTO9C se identificaron morfológicamente sólo a nivel de género. Estas cepas presentaron polifiálides, parecidas en longitud a las de *F. solani*, que a diferencia de esta cepas, produce monofiálides. Las polifiálides, en las tres cepas, presentaron el mismo patrón de ramificación y produjeron abundantes microconidios. Sin embargo, la morfología y pigmentación de la colonia de las cepas FPA1T y FTO1T fue muy parecida, ya que ambas produjeron tonalidades amarillo-anaranjado y micelio abundante. Estas dos cepas fueron aisladas de diferente rancho, pero del mismo cultivar (Nelson). La cepa FTO9C fue aislada del mismo rancho que FTO1T, pero de diferente cultivar (Vesuvio), y su micelio fue blanco y escaso. El análisis de restricción de FPA1T y FTO1T evidenció patrones de bandas muy similares a los obtenidos para *F. solani*, lo cual indica que podrían pertenecer a esta especie. Con respecto a FTO9C, los resultados de RFLP la agruparon con las cepas de *F. oxysporum*. Por último, el análisis de la región EF1 α sólo confirmó la identidad de la cepa FTO1T que mostró 100% de similitud con la cepa NRRL 22585 de *F. solani*. Falta por confirmar la identidad de FPA1T y FTO9C, pero debido a sus características microscópicas, es probable que pertenezcan a *F. solani*. Es importante mencionar que esta especie no ha sido asociada anteriormente al cultivo de clavel. Muchas especies del género *Fusarium* son saprófitos que se encuentran

comúnmente en el suelo; éstas colonizan las raíces enfermas y los tallos, crecen rápidamente en los medios de aislamiento y se pueden aislar fácilmente a partir de material enfermo de raíz y el tallo (Summerell et al., 2003). También se han reportado cepas de *F. solani* no patogénicas que han sido usadas para el control biológico del marchitamiento de tomate, con mayor efectividad que microorganismos comúnmente utilizados como *Burkholderia*, *Gliocladium*, *Pseudomonas* y *Trichoderma* (Larkin y Fravel, 2002). Sin embargo, debe señalarse que esta especie ha sido también reportada como patógeno de un gran número de leguminosas y otras plantas tropicales; se ha asociado con canchales y muerte descendente de árboles y también causa enfermedades en cultivos con gran importancia económica tales como papa, aguacate, cítricos y orquídeas, entre otras. Por lo tanto para determinar si las cepas de *F. solani* aisladas son o no patógenas se requeriría realizar ensayos de patogenicidad en clavel.

La presencia de *F. semitectum* en la zona, fue confirmada por el análisis morfológico, el RFLP y la secuenciación del EF1 α . Una cepa caracterizada morfológicamente como *F. semitectum*, en el análisis del EF1 α mostró mayor similitud con una cepa de *F. equiseti*. Las especies *F. semitectum* y *F. equiseti* están reportadas principalmente como especies saprófitas, sin embargo, esta última reduce o impide la asociación de micorrizas con las raíces al ser un hongo colonizador de la raíz (McAllister et al., 1997). *F. semitectum* también se ha asociado con la infección causada por diferentes hongos en los frutos de Pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) en Malasia (Hawa et al., 2010).

La especie *F. proliferatum* se aisló en la mayoría de los ranchos, excepto en el Pacífico, y se recuperó tanto de la corona como del tallo. Manicom y Baayen (1993) mencionan que es muy común aislar a *F. proliferatum* como co-aislado en claveles que presentan pudrición de la corona, por lo que se le considera como una especie saprófita. Sin embargo, es importante considerar que esta especie, ha sido reportada como patógena en otros cultivos con importancia económica tales como maíz, sorgo, mango y espárragos (Leslie et al., 2006; Morales Rodríguez et al., 2007). Es posible que esta especie pueda causar enfermedad en alguno de los cultivos susceptibles a esta especie en Baja California.

La cepa FTW8T, por su morfología fue identificada como *F. proliferatum*, pero el análisis de secuencias reveló igual similitud con *F. proliferatum* que con *F. fujikuroi* (Teleomorfo *G. fujikuroi*) (Tabla XII). Debido a que esta cepa presentó ligeras diferencias en la forma y pigmentación del micelio, comparada con las cepas que presentaron alto porcentaje de similitud únicamente con *F. proliferatum*, es posible que pertenezca a la especie *F. fujikuroi*. Las especies *F. proliferatum* y *F. fujikuroi* son morfológicamente indistinguibles y filogenéticamente se encuentran estrechamente relacionadas, por lo que existen naturalmente híbridos entre estas dos especies (O'Donnell et al., 1998). Dentro de las características que destacan en *F. fujikuroi* es que puede usarse comercialmente para producción de ácido giberélico (Kumar et al., 1987) y es una fuente potencial comercial de carotenoides (Garbayo et al., 2003).

Las cepas identificadas como *F. oxysporum* y *F. redolens* fueron las más difíciles de diferenciar, pues microscópicamente son muy parecidas. Aunque Gordon (1952) sugirió que la distinción morfológica puede hacerse en base al tamaño de los macroconidios, esto se complica debido a las formas intermedias del hongo, porque se ha reportado que existen cepas de ambas especies que son capaces de formar heterocariones unas con otras y en pruebas serológicas o patrones de bandas en electroforesis de proteínas pueden ser similares (Rataj et al., 1991). El análisis de la presencia y el color de esporodoquios, sugerido por Leslie et al. (2006), permitió su diferenciación. Las cepas que se identificaron como *F. redolens*, produjeron esporodoquios color crema o ligeramente marrón, mientras que los de *F. oxysporum*, cuando se produjeron, fueron de color naranja pálido o intenso. Por otro lado, ambas especies presentaron los mismos sitios de restricción con las enzimas *MspI* y *SmaI* y todas las cepas previamente identificadas morfológicamente como *F. redolens* presentaron mayor porcentaje de similitud con las especies *F. oxysporum*, *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* y *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*, y ninguna presentó similitud con las secuencias de *F. redolens*. Estas dos especies han tenido una historia taxonómica complicada; Wollenweber (1913) reconoció a *F. redolens* como una especie distinta, Booth (1971) manejó a este hongo como una variedad de *F. oxysporum*, mientras que Nelson et al. (1983) reconoció a *F. redolens* como un sinónimo de *F. oxysporum*. Esta controversia continuó

hasta que las dos especies fueron definidas utilizando métodos basados en el ADN (ITS-RFLP y análisis de secuencias de la región ITS). Estos estudios revelaron que *F. oxysporum* y *F. redolens*, además de ser especies diferentes, no están estrechamente relacionadas (Waalwijk et al., 1996; O'Donnell et al., 1998; Gams et al., 1999; Baayen et al., 2000). En estos trabajos Baayen et al. (2001), describieron que la raza 3 de *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* corresponde en realidad a la especie *F. redolens* f. sp. *dianthi*; incluso mencionan que dentro de esta última se han descrito cuatro grupos de compatibilidad vegetativa y que cada grupo corresponde a una raza distinta. Tanto *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* como *F. redolens* f. sp. *dianthi*, colonizan los vasos del xilema y causan síntomas de marchitez indistinguibles. Se considera importante que en estudios posteriores se corrobore la identificación morfológica de *F. redolens* con el uso de oligonucleótidos específicos como los desarrollados por Bogale et al. (2007), los cuales amplifican un fragmento del gen EF1 α únicamente en esta especie. Sin embargo, en base a los resultados moleculares que indican que estas cepas corresponden a *F. oxysporum*, existe la posibilidad de que la diferencia morfológica observada en ellas se deba a la existencia de razas patogénicas.

La cepa FRO14C se identificó morfológicamente como *F. oxysporum*, pero en el análisis de RFLP presentó sitios de restricción diferentes a los reportados para esta especie (Lee et al., 2000; Chehri et al., 2011). La identificación morfológica se confirmó con el análisis de secuencias, ya que esta cepa presentó un 97% de similitud con la cepa NNRL 52724 de *F. oxysporum*. Los resultados del RFLP indican la posibilidad de que esta cepa sea una forma especial o raza distinta a las demás cepas aisladas.

Las cepas identificadas como *F. solani*, *F. semitectum* y algunas de *F. oxysporum* produjeron clamidosporas, alrededor de los 15 días en cultivo y *F. proliferatum* produjo esclerocios. Estas estructuras de resistencia aseguran el estado latente del hongo en el campo, por lo cual es difícil erradicarlos del cultivo. Otras estructuras encontradas en algunas cepas fueron hifas estériles enrolladas; cabe mencionar que de acuerdo con lo descrito por Leslie et al. (2006), las únicas especies que producen este tipo de estructuras son *F. circinatum*, *F. pseudocircinatum* y *F. sterilihyphosum*. En este caso, las cepas que

produjeron estas estructuras fueron identificadas como *F. solani*, *F. oxysporum* y *F. proliferatum*, lo cual indica que existe una confusión en la definición de hifas estériles enrolladas ó que las hifas estériles enrolladas no son exclusivas de las especies mencionadas por estos autores.

Las cepas identificadas morfológicamente como *F. proliferatum*, *F. solani* y *F. semitectum*, fueron confirmadas molecularmente ya que presentaron concordancia con los patrones RFLP descritos por Lee et al. (2000) y Chehri et al. (2011). Las especies identificadas morfológicamente como *F. globosum* y *F. tricinctum*, en el análisis de restricción mostraron un patrón de bandas con tamaño similar al de las cepas identificadas como *F. solani*. En estos casos particulares la morfología fue determinante para identificar correctamente las especies. Esto resalta la importancia de utilizar de manera complementaria los diferentes conceptos de especie, tal como lo sugiere Geiser et al., (2004).

En los cuatro ranchos, las especies que presentaron mayor prevalencia fueron *F. oxysporum* y *F. redolens*. Estas especies se encontraron asociadas con casi todos los cultivares muestreados en la zona. En la mayoría de las plantas únicamente se encontró una o dos especies asociadas al mismo cultivar a lo largo de la planta. Estos datos son importantes porque los cultivares tienen diferentes niveles de resistencia a *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* raza fisiológica 2, de acuerdo con el proveedor de estas plantas (HilverdaKooil plant technology). Esto indica que los cultivares en los que se encontraron asociadas estas especies han perdido la resistencia, u otras razas están causando los síntomas observados en las plantas. Aunque no se hicieron pruebas de patogenicidad, la especie *F. redolens* (considerada la raza 3 de *F. redolens* f. sp. *dianthi*) podría estar causando los síntomas de marchitez. También cabe la posibilidad de que la cepas identificadas como *F. oxysporum* pertenezcan a una raza diferente. Chiocchetti et al. (1999), diseñaron oligonucleótidos específicos para identificar las razas 1, 2, 4 y 8 de *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*, por lo que estos podrían ser utilizados para caracterizar a nivel de raza las cepas que ya han sido

identificadas morfológica y molecularmente como *F. oxysporum* y *F. redolens* en este estudio. Adicionalmente se sugiere realizar pruebas de patogenicidad.

IX. Conclusiones

En el estado de Baja California se realizaron muestreos en los ranchos Twins, Pacífico, El Toro y La Rosalera, encontrándose en todos ellos plantas de clavel con síntomas característicos de marchitez vascular y pudrición del tallo, por lo que se ratificó la existencia de estas enfermedades en los cultivos producidos en la zona.

Se colectaron muestras de tejido de 24 cultivares de clavel con síntomas de marchitez y de ellos se aislaron 64 cepas con características propias del género *Fusarium*, lo cual evidencia la asociación de especies de este género con las enfermedades de marchitez en clavel.

Las cepas fúngicas pudieron identificarse bajo el concepto morfológico de especie encontrándose tres presuntamente patógenas: *F. oxysporum*, *F. redolens* y *F. tricinctum* y cuatro saprófitas: *F. proliferatum*, *F. solani*, *F. semitectum* y *F. globosum*.

Las técnicas moleculares utilizadas en este estudio permitieron confirmar la identificación de cinco especies: *F. oxysporum*, *F. tricinctum*, *F. proliferatum*, *F. solani* y *F. semitectum*. Únicamente *F. globosum* y *F. redolens* quedaron pendientes de confirmar. En el caso de esta última, se considera conveniente utilizar oligonucleótidos específicos para facilitar su identificación; además se considera importante su tipificación porque esta especie es capaz de producir los mismos síntomas de enfermedad que *F. oxysporum* en las plantas de clavel.

La especie *F. oxysporum* prevaleció en todos los sitios de muestreo, a pesar de que los cultivares de donde fue aislada están catalogados como resistentes a *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* raza fisiológica 2. Estos resultados podrían indicar que la raza 2 está presente en los ranchos muestreados en Baja California y que los cultivares de los cuales fueron aisladas las cepas, han perdido la resistencia a esta raza. Sin embargo, también cabe la posibilidad de que exista más de una raza del género *Fusarium* en estos sitios.

La especie *F. tricinctum* que se ha reportado como agente causal de la pudrición de yemas fue encontrada únicamente en el cultivar Delphi del Rancho La Rosalera, pero en este caso fue aislado de la corona y tallo de la planta. Se cree que quizás esta especie además de dañar las yemas de la planta, es capaz de afectar otros tejidos en clavel, por lo que se considera necesario realizar pruebas de patogenicidad con esta especie.

Las especies *F. semitectum* y *F. proliferatum*, se encontraron presentes en los ranchos Twins, el Toro y la Rosalera, tanto en la corona como en el tallo de las plantas. Estas especies han sido reportadas como saprófitas en el cultivo de clavel, por lo que no se considera necesario realizar pruebas de patogenicidad con ellas.

Las especies *F. globosum* y *F. solani*, no habían sido asociadas al cultivo de clavel. En este estudio, *F. globosum* se encontró presente únicamente en el rancho Twins y *F. solani* en los ranchos Pacífico, el Toro y la Rosalera. Se considera importante elucidar la función de estas especies. En el caso específico de *F. solani* es necesario realizar ensayos *in vitro* para determinar su posible potencial como agente de control biológico, ya que en algunos estudios se han reportado cepas que tienen esta característica.

Ninguna de las especies asociadas a la pudrición del tallo, *F. avenaceum*, *F. culmorum* y *F. graminearum* fueron identificadas en este estudio; sin embargo, no se descarta su presencia en la zona.

En el presente trabajo, el uso de las técnicas morfológicas y moleculares permitió confirmar la presencia de varias especies del género *Fusarium* asociadas a plantas de clavel con síntomas de marchitez. Debido a esto, se sugiere que ambas técnicas sean utilizadas en conjunto en futuros estudios sobre el tema.

X. Recomendaciones para trabajo a futuro

Concluir con el análisis molecular de las cepas que quedaron pendientes de secuenciar

Utilizar oligonucleótidos específicos o conseguir cepas de referencia para identificar molecularmente a nivel de raza fisiológica las cepas que fueron identificadas morfológicamente como *F. oxysporum* y *F. redolens*.

Realizar pruebas de competencia *in vitro* con cepas de dos especies diferentes que hayan sido aisladas de la misma planta (por ejemplo *F. oxysporum* y *F. solani*), para determinar el efecto que causa una sobre la otra y la posible función de *F. solani* como agente de control biológico o viceversa.

Realizar pruebas de patogenicidad con cepas de *F. solani*, *F. globosum* y *F. tricinctum*, para elucidar su función en el cultivo de clavel.

Obtener nuevos aislamientos de clavel con síntomas de pudrición basal, para ratificar la presencia o ausencia de las especies *F. avenaceum*, *F. culmorum* y *F. graminearum* en los cultivos de clavel del estado de Baja California.

Literatura citada

- Abd-Elsalam K. A., I. N. Aly, M. A. Abdel-Satar, M. S. Khalil y J. A. Verreet. 2003. PCR identification of *Fusarium* genus base on nuclear ribosomal-DNA sequence data. African Journal of Biotechnology. 2(4): 82-85.
- Afanador Pérez A. M. 2005. Propagación *in vitro* a partir de meristemos de cinco variedades comerciales de *Dianthus caryophyllus* L. (clavel). Tesis de Grado. Colombia. 137 p.
- Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology. 5th. ed. Elsevier. 922 p.
- Andrés Ares, J. L., J. C. Urquijo y J. T. Marquina. 1999. Incidencia de la fusariosis vascular en los cultivos de clavel de Galicia. Boletín de Sanidad Vegetal de Plagas. 25: 181-193.
- Andrés J. L., M. J. Vicente, J. L. Cenis, J. Collar, J. Tello y D. Cifuentes. 2001. Variación genética y patogénica de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* en España. Boletín de Sanidad Vegetal de Plagas. 27: 249-257.
- Baayen, R. P., K. O'Donnell, P. J. M. Bonants, E. Cigelnik, L. P. N. M. Kroon, E. J. A. Roebroek y C. Waalwijk. 2000. Gene genealogies complex identify monophyletic and nonmonophyletic formae specialis causing wilt and rot disease. Phytopathology. 90(8): 891-900.
- Baayen, R. P., K. O'Donnell, S. Breeuwsma, D. M. Geiser y C. Waalwijk. 2001. Molecular relationships of fungi within the *F. redolens*- *F. hostae* clade. Phytopathology. 91(11): 1037-1044.
- Bogale, M., B. D. Wingfield, M. J. Wingfield, E. T. Steenkamp. 2007. Species specific primers for *Fusarium redolens* and a PCR-RFLP technique to distinguish among three clades of *Fusarium oxysporum*. FEMS Microbiology Letters. 271(1): 27-32.
- Booth, C. 1971. The genus *Fusarium* Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, United Kingdom. En: Leslie, J. F., B. A. Summerell y S. Bullock. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing. 1a. Ed. USA. 388 p.

- Carbone, I. y Kohn L.M. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*. 91: 553-556.
- Cherhi, K., B. Sallenh, T. Yli-Mattila, K. R. N. Reddy y S. Abbasi. Molecular characterization of pathogenic *Fusarium* species in cucurbit plants from Kermanshah province, Iran. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 18(4): 341-351.
- Chiocchetti, A., I. Bernardo, J. Daboussi, A. Garibaldi, M. L. Gullino. T. Langin y Q. Migheli. 1999. Detection of *Fusarium oxysporum* f.sp *dianthi* in carnation tissue by PCR amplification of transposon insertions. *Phytopathology*. 89(12): 1169-1175.
- Cortazar Martínez. A. y P. E. Silva Rincón. 2004. Métodos Fisicoquímicos en biotecnología. En línea: <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/pcr.pdf>.
- Crous P. W., K. Tanaka, B. A. Summerell y J. Z. Groenelwald. 2011. Additions to the *Mycosphaerella* complex. *IMA Fungus*. 2(1): 49-64.
- Fisher, N. L., L. W. Burgess, T. A. Toussoun, y P. E. Nelson. 1982. Carnation Leaves as a substrate and for preserving cultures of *Fusarium* species. *Phytopathology*. 72(1): 151-153.
- FUSARIUM-ID. En línea: <http://isolate.fusariumdb.org> [Fecha de consulta: enero 2012].
- Gams, W., M. Klammer y K. O'Donnell. 1999. *Fusarium miscanthi* sp. Nov. from *Miscanthus* litter. *Mycologia*. 91(2): 263-268.
- Garbayo, I., C. Vilchez, J. E. Nava Saucedo y J. N. Barbotin. 2003. Nitrogen, carbon and light-mediated regulation studies of carotenoid biosynthesis in immobilized mycelia of *Gibberella fujikuroi*. *Enzyme and Microbial Technology*. 33: 629-634.
- Garcés de Granada E., M. Orozco de Mezquita, G. R. Bautista y H. Valencia. 2001. *Fusarium oxysporum* el hongo que nos falta conocer. *Acta Biológica Colombiana*. 6 (1): 7-25.
- García García V. y S. L. Camargo Ricalde. 2006. Hongos Fitopatógenos del clavel (*Dianthus caryophyllus*). *Casa del tiempo*. 92: 57-62.
- Geiser, D. M., M. M. Jimenez-Gasco, S. Kang, I. Makalowska, N. Veeraraghavan, T. J. Ward, N. Zhang, G. A. Kuldau y K. O'Donnell. 2004. FUSARIUM-ID v. 1.0: a DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology*. 110: 473-479.

- Gerlach, W. y H. Nirenberg. 1982. The genus *Fusarium* a pictorial atlas. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft Berlin Dahlem, 1-406. En: Leslie, J. F., B. A. Summerell y S. Bullock. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing. 1a. Ed. USA. 388 p.
- Harbaugh, B. K. y R. J. McGovern. 2000. Susceptibility of forty-six *Lisianthus* cultivars to *Fusarium* crown and stem rot. HortTechnology. 10: 816-819.
- Hawa, M. M., B. Salleh y Z. Latiffah. 2010. Characterization and intraspecific variation of *Fusarium semitectum* (Berkeley and Ravenel) associated with red-fleshed dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus* [Weber] Britton and Rose) in Malaysia. African Journal of Biotechnology. 9(3): 273-284.
- HilverdaKooij plant technology. 2009-2010. Carnation catalogue.
- Infoagro. En línea: www.infoagro.com [Fecha de consulta: julio 2010.]
- Kalc Wright G. F., M. Say, L. G. Pascoe y D. I. Guest. 1997. Incidence and symptoms of *Fusarium* diseases of carnations in Victoria. Australasian Plant Pathology. 26: 44-53.
- Kumar, P. K. R. y B. K. Lonsane. 1987. Gibberellic acid by solid state fermentation: Consistent and improved yields. Biotechnology and Bioengineering. 30: 267-271.
- Larkin R. P. y D. R. Fravel. 2002. Effects of varying environmental conditions on biological control of *Fusarium* wilt of tomato by nonpathogenic *Fusarium* spp. Phytopathology. 92(11): 1160-1166.
- Lee, Y-M., Y-K. Choi y B-R. Min. 2000. PCR-RFLP and sequence analysis of the rDNA ITS region in the *Fusarium* spp. The Journal of Microbiology. 38(2): 66-73.
- Leslie, J. F., B. A. Summerell y S. Bullock. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing. 1a. Ed. USA. 388 p.
- Lievens B, M. Rep y B. Thomma. 2008. Recent developments in the molecular discrimination of formae speciales of *Fusarium oxysporum*. Pest Management Science. 64: 781-788.
- Lopez, J. 1989. Producción de claveles y gladiolos. Ediciones Mundiprensa 112p. En: Afanador Pérez A. M. 2005. Propagación *in vitro* a partir de meristemas de cinco variedades comerciales de *Dianthus caryophyllus* L. (clavel). Tesis de Grado. Colombia. 137 p.

- Lorraine M. M., W. F. O. Marasas, H. F. Vismer, L. de Vos, J. P. Rheeder, R. H. Proctor y B. D. Wingfield. 2010. Molecular characterization of *Fusarium globosum* strains from South African maize and Japanese wheat. *Mycopathologia*. 170(4):237-249.
- Luque Félix R. y J. G. Osuna Millán. 2011. La producción de flores en Baja California. Consulta en línea: <http://www.bajaeco.com> [Fecha de consulta: noviembre de 2011].
- Manicom B. Q. y R. P. Baayen. 1993. Restriction fragment length polymorphisms in *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* and other fusaria from *Dianthus* species. *Plant Pathology*. 42: 851-857.
- Manulis S., N. Kogan, M. Reuven y Y. Ben-Yephet. 1993. Use of the RAPD technique for identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* from carnation. *Phytopathology*. 84(1): 98-101.
- Marín García P. 2010. Análisis de factores ecofisiológicos que influyen en la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de toxinas en especies de *Fusarium*. Tesis Doctoral. Madrid. 237 p.
- Martínez Fernández E. 2008. Hongos patógenos del cultivo del clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) en el estado de Morelos, México. *Investigación Agropecuaria*. 5(1): 1-8.
- McAllister, C. B., J. M. García-Garrido, I. García-Romera, A. Godeas y J. A. Ocampo. 1997. Interaction between *Alternaria alternata* or *Fusarium equiseti* and *Glomus mosseae* and its effects on plant growth. *Biology and Fertility of Soils*. 24(3): 301-305
- Montes, B., A. Restrepo y J. G. McEwen. 2003. Nuevos conceptos sobre la clasificación de hongos y su posible aplicación medica. *Biomédica*. 23(2): 213-224.
- Moore D. y L. A. Novak F. 2002. *Essential Fungal Genetics*. Springer. New York. 357 p.
- Morales Rodrigéz, I., M. J. Yanez-Morales, H. V. Silva Rojas, G. Garcia de los Santos y D. A. Guzman de Pena. 2007. Biodiversity of *Fusarium* species in Mexico associated with ear rot in maize, and their identification using a phylogenetic approach. *Mycopathologia*. 163(1): 31-39.
- Mycobank. En línea: www.mycobank.org [Fecha de consulta: diciembre de 2011]
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). En línea: www.ncbi.nlm.nih.gov [Fecha de consulta: enero 2012].

- Nelson P. E., B. W. Pennypacker, T. A. Toussoun y R. K. Horst. 1975. *Fusarium* stub dieback of carnation. *Phytopathology*. 65: 575-581.
- Nelson P. E., T. A. Marasas, W. F. O. 1983. *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press, University Park. En: Leslie, J. F., B. A. Summerell y S. Bullock. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing. 1a. Ed. USA. 388 p.
- Nitschke E., M. Nihlgard y M. Varrelmann. 2009. Differentiation of eleven *Fusarium* spp. isolated from sugar beet, using restriction fragment analysis of a polymerase chain reaction-amplified translation elongation factor 1 α gene fragment. *Phytopathology*. 99(8): 921-929.
- O'Donnell K., E. Cigelnik y H. I. Nirenberg. 1998. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*. 90 (3): 465-493.
- O'Donnell K., H. C Kistler, E. Cigelnik y R. C. Ploetz. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 95: 2044-2049.
- Plantas y Hongos. En línea: www.plantasyhongos.es [Fecha de consulta: diciembre de 2011]
- Rataj-Guranowska, M., A. Paszewski y I. Walkowiak. 1991. *Fusarium oxysporum* forms heterokaryons with *Fusarium redolens*. 132(4): 294-302.
- Rheeder, J. P., W. F. O. Marasas y P. E. Nelson. 1996. *Fusarium globosum*, a new species from corn in southern Africa. *Mycologia*. 88: 509-513.
- Sarrocco, S., N. Falaschi, M. Vergara, F. Nicoletti y G. Vannacci. 2007. Use of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* transformed with marker genes to follow colonization of carnation roots. *Journal of Plant Pathology*. 89(1):47-59.
- Seifert K. A. y C. André Lévesque. 2004. Phylogeny and molecular diagnosis of mycotoxigenic fungi. *European Journal of Plant Pathology*. 110(5-6): 449-471.
- SIAP 2010. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. En línea: www.siap.gob.mx [Fecha de consulta: julio 2010]
-

- Snyder, W. C., H. N. Hansen y J. W. Oswald. 1956. Cultivars of fungus, *Fusarium*. Journal of Madras University B. 27: 185-192. En: Leslie, J. F., B. A. Summerell y S. Bullock. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing. 1a. Ed. USA. 388 p.
- Soto Sedano. J. C., F. E. Pabón Barreto y J. J. Filgueira Duarte. 2009. Relación entre el color de la flor del clavel (*Dianthus caryophyllus*) y la tolerancia a patógenos del género *Fusarium*. Facultad de Ciencias Básicas. 5 (1): 116-129.
- Suk Han K., J. Han Park y Y. Mun Choi. 2001. Stub dieback of carnation caused by *Fusarium graminearum*. Plant Pathology. 17 (2): 101-105.
- Summerell, B. A., B. Salleh y J. F. Leslie. 2003. A Utilitarian approach to *Fusarium* identification. Plant Disease. 87: 117-128.
- Trail F., I. Gaffoor y S. Vogel. 2005. Ejection mechanics and trajectory of the ascospores of *Gibberella zeae* (anamorph *Fusarium graminearum*). Fungal Genetics and Biology. 42 (6): 528-533.
- Trujillo E., B. Moreno, R. Acevedo y R. Vera. 2005. Variabilidad genética de *Fusarium* spp., causante de la marchitez en clavel, determinada mediante electroforesis. Fitopatología Venezolana. 18: 9-14.
- Waalwijk C., J. R. A. Koning y R. P. Baayen. Discordant groupings of *Fusarium* spp. from sections *Elegans*, *Liseola* and *Dlaminia* based on ribosomal ITS1 and ITS2 sequences. Mycologia. 88(3): 361-368.
- White, T.J.; Bruns, T.D.; Lee, S. y Taylor, J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: PCR protocols: A Guide to Methods and Applications (M. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White, ed.), Academic Press. San Diego, CA, USA, 315-322.
- Wollenweber, H. W. y Reinking O. A. 1935. Die Fusarien, ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekämpfung. Paul Parey, Berlin Germany. En: Leslie, J. F., B. A. Summerell y S. Bullock. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing. 1a. Ed. USA. 388 p.
-