

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
COLEGIO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
FACULTAD DE AGRONOMÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS



TESIS

**BÚSQUEDA DE MULTIRESISTENCIA GENÉTICA EN GENOTIPOS DE
GARBANZO A *F. solani* y *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (Raza 5)
GENERADOS EN SONORA**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**PRESENTA
LORENA MOLINA CÁRDENAS**

**DIRECTOR DE TESIS
DRA. TERESA DE JESÚS VELÁZQUEZ ALCARAZ**

**CO-DIRECTOR DE TESIS
M.C. SIXTO VELARDE FÉLIX**

CULIACÁN, SINALOA, ABRIL DE 2014.

ESTA TESIS FUE REALIZADA POR BIOL. **LORENA MOLINA CÁRDENAS**,
BAJO LA DIRECCIÓN DEL CONSEJO PARTICULAR QUE SE INDICA, Y HA
SIDO APROBADA POR EL MISMO, COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

CONSEJO PARTICULAR

DIRECTORA

DRA. TERESA DE JESUS VELÁZQUEZ ALCARAZ

CO-DIRECTOR

M.C. SIXTO VELARDE FÉLIX

ASESOR

DR. LEOPOLDO PÁRTIDA RUVALCABA

ASESOR

DR. TOMAS DIAZ VALDÉS

ASESOR

M.C. MOISES GILBERTO YAÑEZ JUAREZ

CULIACÁN, SINALOA, ABRIL DE 2014.



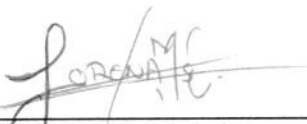
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
COLEGIO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
FACULTAD DE AGRONOMÍA CULIACÁN
FACULTAD DE AGRONOMÍA VALLE DEL FUERTE
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
FACULTAD DE AGRONOMÍA VALLE DEL CARRIZO

En la Ciudad de Culiacán Rosales, Sinaloa, el día 20 de enero del año 2020, la que suscribe Lorena Molina Cárdenas, alumna del Programa de Maestría en Ciencias Agropecuarias, con número de cuenta 0236974-5, de la Unidad Académica Facultad de Agronomía, del Colegio de Ciencias Agropecuarias de la UAS, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Teresa de Jesús Velázquez Alcaraz y del M. C. Sixto Velarde Félix y cede los derechos del trabajo titulado “Búsqueda de Multirresistencia genética en genotipos de Garbanzo a *F. solani* y *F. oxysporum* f. sp. ciceris (Raza 5) generados en Sonora.”, a la Facultad de Agronomía, del Colegio de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Sinaloa, para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales, todo esto en apego al artículo 27 de la Ley Federal de Derechos de Autor.

La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México) protege el contenido de la presente tesis. Los usuarios de la información contenida en ella deberán citar obligatoriamente la tesis como fuente, dónde la obtuvo y mencionar al autor intelectual. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ATENTAMENTE



Lorena Molina Cárdenas

DEDICATORIA

A mis padres

Marcelino Molina Chávez quien tuvo que viajar para los Estados Unidos para darnos una mejor calidad de vida, sacrificando el convivir con nosotros y Juana Cárdenas Quiñonez quien hizo el papel de padre y madre, cuando mi papá estaba ausente, ellos dieron todo de sí para sacarnos adelante a mis hermanos y a mí, por lo cual siempre estaré agradecida. Gracias por haberme traído al mundo, educarme, apoyarme, estar conmigo en todo momento, guiarme por el buen camino y por todo lo que me han enseñado. De corazón los amo.

A mis hermanos

Por ayudarme cuando los he necesitado, vivir tantas cosas juntos desde las alegrías y tristezas cuando nuestro padre estaba lejos de nosotros. Raymundo, Marcelino y J. Enrique, los quiero mucho.

A mis sobrinos

Michelle Daniela, José Raymundo y Ángel, que han sido un motor en mi vida impulsándome a seguir adelante, por su cariño y amor. Gracias por esa hermosa palabra que sale de sus boquitas al decirme tía. Por supuesto a la mujer que les dio la vida mí cuñada María José. Los amo.

A Sixto Velarde Félix

Quien siempre estuvo dispuesto a compartir su tiempo para enseñarme, guiarme, apoyarme no terminaré de agradecerle por todo lo que ha hecho por mí, aparte de ser mi maestro lo veo como un gran amigo al cual veo con mucho cariño y respeto. Sixto te quiero mucho, de corazón gracias.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme la dicha de existir y tener una familia incondicional que siempre está conmigo.

A la Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS), por abrir sus puertas y por haber formado parte de mi educación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por haberme proporcionado el apoyo económico para la realización de mis estudios de maestría.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Experimental Valle de Culiacán, por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo en la Unidad de Biotecnología.

Al Dr. Leopoldo Partida Ruvalcaba, por su comprensión, apoyo y atenciones que me brindó durante la maestría.

Al M.C. Blas Galván Piña, por su importante aportación en este trabajo de tesis.

A mis amigos y compañeros de laboratorio Nallely, Ramón, Frank y Sixto. Gracias por todos los momentos que hemos vivido, apoyo, amistad y compañía que me han brindado más allá de compartir la escuela conmigo, como también su aportación para la realización de esta tesis.

A toda mi familia desde mis abuelos, tías y primos, por siempre estar pendiente si necesitaba algo en lo cual me podrían ayudar, confiar en mí y estar ahí para compartir todos mis logros.

A Angélica, Adela, Ariadna, que más que contar con ellas como tías y prima respectivamente, son como las hermanas que no tuve. Le doy gracias a dios por contar con ustedes, confiar en mí, desvelarse conmigo ayudándome, pasar todo tipo de momentos juntas. Las quiero hermosas.

A Eduardo alguien muy especial en mi vida, quien dedicaba de su tiempo para estar conmigo ayudándome y haciéndome compañía. Alentándome a seguir adelante, confiar en mí y por su apoyo incondicional. Te quiero mucho.

A mis amigos que hoy en día ya forman parte de mí familia.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
ÍNDICE DE CUADROS-----	i
ÍNDICE DE FIGURAS-----	iii
RESUMEN-----	viii
ABSTRAC-----	ix
I. INTRODUCCIÓN-----	1
II. ANTECEDENTES-----	3
-	
III. JUSTIFICACIÓN-----	4
IV. HIPÓTESIS-----	5
V. OBJETIVOS-----	5
VI. REVISIÓN DE LITERATURA-----	6
6.1. Origen y distribución del garbanzo-----	6
6.2. Taxonomía del garbanzo-----	6
6.3. El cultivo del garbanzo en México-----	7
6.3.1. Variedades de garbanzo generadas en el Noroeste de México---	8
6.3.2 Cultivo de garbanzo en Sonora-----	10
6.3.3. Panorama del cultivo del garbanzo a nivel mundial-----	12
6.3.4.Aspectos fitosanitarios del cultivo-----	14
6.3.5. Cultivares resistentes del garbanzo como uso del control a la Fusariosis-----	17
6.3.6. Uso de marcadores moleculares del garbanzo como fuente de	19

control de la fusariosis vascular-----	
6.4. El género <i>Fusarium</i> -----	20
6.4.1. Clasificación taxonómica del género <i>Fusarium</i> -----	22
6.4.2. Descripción Filogenética de <i>Fusaria</i> -----	23
6.5. <i>Fusarium solani</i> -----	24
6.5.1. Descripción morfológica-----	24
6.5.2. Distribución geográfica y patogénesis-----	25
6.5.3. Sintomatología -----	27
6.5.4. Reservorios de <i>F. solani</i> -----	27
6.5.5. Hospedantes-----	28
6.6. <i>Fusarium oxysporum</i> -----	28
6.6.1. Descripción morfológica-----	29
6.7. <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> -----	31
6.7.1. Distribución geográfica y patogénesis-----	34
6.7.2. Sintomatología-----	35
6.7.3. Reservorios de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> -----	36
6.7.4 Variabilidad patogénica-----	38
6.8. Diferencia entre <i>F. solani</i> y <i>F. oxysporum</i> -----	39
6.9. Métodos y Técnicas de biología molecular-----	40
6.9.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).-----	40
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS-----	41
7.1. Colecta de plantas-----	41

7.2. Aislamiento, propagación y conservación de aislados monospóricos de <i>Fusarium</i> -----	41
7.3. Extracción de ADN de los cultivos monospóricos-----	43
7.4. Amplificación mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)-----	44
7.5. Identificación de razas fisiológicas-----	45
7.6. Análisis electroforético para la separación de los productos amplificados-----	46
7.7. Análisis de resistencia y susceptibilidad a <i>F. solani</i> y raza 5 de <i>Foc</i> en genotipos de garbanzo-----	46
7.8. Planteamiento experimental-----	49
7.9. Análisis estadístico-----	54
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN-----	56
8.1. Colecta de plantas, aislamiento, identificación morfológica de <i>Fusarium</i> spp. y extracción de ADN-----	56
8.2. Identificación molecular mediante PCR de <i>Fusarium</i> spp. y análisis electroforético de los amplificados-----	57
8.2.1. Detección de <i>Fusarium oxysporum</i> mediante PCR-----	57
8.2.2. Detección de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> mediante PCR--	58
8.2.3. Detección de raza 5 de <i>Foc</i> mediante PCR-----	59
8.3. Análisis de multiresistencia genética-----	60
IX. CONCLUSIONES-----	71
X. LITERATURA CITADA-----	72

ANEXOS-----

ABREVIATURAS

° C: Grados centígrados

µg: Microgramo

µL: Microlitro

ADN Taq Pol: Enzima ADN polimerasa de la arqueobacteria *Thermus aquaticus*

ADN: Ácido desoxirribonucleico

APS: Sociedad Americana de Fitopatología (por sus siglas en ingles)

Cm: Centímetro

cm²: Centímetro cuadrado

CLA: Medio de cultivo Agar-Hoja de Clavel

CTAB: Cetil-dimetil-etil-bromuro de amonio

dNTP's: Deoxil-nucleótido-trifosfatos

dds: Días después de la siembra

EDTA: Acido etilen-dinitrilo-tetracético

FAOSTAT:

f. sp. *formae specialis*, formas especiales

Foc: Fusarium oxysporum f. sp. *Ciceris*

g: Gramo

ICRISAT: Instituto de Investigación de Cultivos Tropicales Semiáridos

INIFAP: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias

K₂HPO₄ : Fosfato dibásico de Potasio

Kg/ha: Kilogramo por hectárea

L: Litro

mm: milímetro

M: Molar

Mb: Megabases

Mg: Milogramo

MgCl₂ : Cloruro de Magnesio

MgSO₄: Sulfato de Magnesio

min: Minutos

ml: Mililitro

mM: Milimolar

NaCl: Cloruro de Sodio

NaOH: Hidroxido de Sodio

ng: Nanogramos

pb: Pares de bases

PCNB: Penta-cloro-nitro-benceno y cloranfenicol

PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa

PDA: Medio papa-dextrosa-agar

pH: Potencial de hidrogeno

pmoles: picomoles

r.p.m: Revoluciones por minuto

seg: Segundos

T: Temperatura

U/μL: Unidades por microlitro

ufc: Unidades formadoras de colonia

UV: Ultravioleta

v/v: Volumen por volumen

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Superficie de siembra y rendimiento del garbanzo (Otoño- Invierno) en el periodo 2012-2013 en la región del Noroeste de México-----	10
Cuadro 2. Variedades de garbanzo generadas en el Campo Experimental Costa de Hermosillo, Sonora (INIFAP)-----	11
Cuadro 3. Estadísticas de producción (ton) de garbanzo por países en el periodo 2012-2013-----	13
Cuadro 4. Estadísticas de exportación (ton) de garbanzo por países en el periodo 2012-2013-----	13
Cuadro 5. Medio de cultivo selectivo (Komada modificado) para aislar a <i>Fusarium spp</i> -----	42
Cuadro 6. Condiciones de temperaturas de alineamiento y secuencias de iniciadores para la identificación de <i>Fo</i> , <i>Foc</i> y razas fisiológicas mediante PCR-----	45
Cuadro 7. Lista de las líneas diferenciales de garbanzo seleccionadas como testigos a sus reacciones <i>F. solani</i> y a raza 5-----	48
Cuadro 8. Escala de puntuación de la enfermedades utilizado en las líneas diferenciales de garbanzo para la resistencia y susceptibilidad a <i>Fusarium solani</i> y a la raza 5-----	48
Cuadro 9. Genotipos evaluados-----	49

Cuadro 10.	Arreglo factorial de los genotipos-----	50
Cuadro 11.	Diseño de tratamientos en los genotipos-----	51
Cuadro 12.	Escala arbitraria de Horsfall y Barrat, para medir la sintomatología ocasionada por <i>F. solani</i> -----	53
Cuadro 13.	Escala arbitraria de Horsfall y Barrat, para medir la sintomatología ocasionada por R5 de <i>Foc</i>	54
Cuadro 14.	Escala de Nava-Cortés <i>et al.</i> , (2007), para medir el porcentaje de plantas vivas y muertas-----	54
Cuadro 15.	Comparación de la severidad media ¹ ocasionada por <i>F.</i> <i>solani</i> y raza 5 de <i>Foc</i> . A los 43 días después de la siembra-	67
Cuadro 16.	Resultados por genotipo de garbanzo, en <i>F. solani</i> y raza 5 de <i>Foc</i> . En base a la escala de severidad de los daños propuesta por Nava-Cortés (2007)-----	69

ÍNDICE DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1.	Morfología de <i>F. solani</i> : a)Macroconidias b)Microconidias c)Microconidias <i>in situ</i> en medio CLA-----	25
Figura 2.	Morfología de <i>F. solani</i> : a)Macroconidias b)Microconidias c)Microconidias <i>in situ</i> en medio CLA-----	30
Figura 3.	Cepa obtenida por cultivo monospórico de <i>Fusarium</i> spp.----	56
Figura 4.	<i>F. oxysporum</i> : A) Macro y microconidias B) Microconidias <i>in situ</i> en medio CLA-----	56
Figura 5.	Detección de <i>Fusarium oxysporum</i> aislado en plantas de garbanzo. Carril 1, marcador de tamaño molecular 1 Kb Ladder; carriles 2-7 se observa la separación electroforética de los amplicones de PCR obtenidos con el uso de iniciadores específicos para <i>Fo</i> , carril 8, se observa el amplicón usado como control positivo, carril 9, control negativo (sin ADN). En los carriles 2 y 7 se observa el fragmento de 350 pb correspondiente al amplicón predicho para a <i>Fo</i> , con el uso de iniciadores reportados por Mishra <i>et al.</i> , (2003)-----	57
Figura 6.	Detección de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> aislado en plantas de garbanzo. Carril 1, marcador de tamaño molecular 1 Kb Ladder; carril 2, se observa el control positivo, carril 3,	58

control negativo (sin ADN), carriles 4-8 se observa la separación electroforética de los amplicones de PCR obtenidos con el uso de iniciadores específicos para *Foc*. En los carriles 4 y 8 se observa el fragmento de 1500 pb correspondiente al amplicón predicho para a *Foc*, con el uso de iniciadores reportados por Jiménez-Gasco y Jiménez-Díaz (2003)-----

Figura 7.	Detección de la raza 5 aislada en plantas de garbanzo. Carril 1, marcador de tamaño molecular Hypper Ladder IV; carriles 2-7 se observa la separación electroforética de los amplicones de PCR obtenidos con el uso de iniciadores específicos para la raza 5, carril 8 se observa el control positivo, carril 9, control negativo (sin ADN). En los carriles 2 y 7 se observa el fragmento de 900 pb correspondiente al amplicón predicho para la raza 5, con el uso de iniciadores reportados por Jiménez-Gasco y Jiménez-Díaz (2003)-----	59
Figura 8.	Genotipos experimentales sin inóculo-----	60
Figura 9	Genotipo HOGA 021 (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C)-----	61
Figura 10.	Genotipo HOGA 067 (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C)-----	61
Figura 11.	Genotipo HOGA 2001-2-2 (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C)-----	61

Figura 12.	Genotipo HOGA 2002-6-3 (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C)-----	61
Figura 13.	Genotipo HOGA 2002-40-6 (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C)-----	61
Figura 14.	Genotipo HOGA 2001-4-4 (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C)-----	61
Figura 15.	Genotipo HOGA 2000-8-1 (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C)-----	62
Figura 16.	Genotipo HOGA 2004-20-6 (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C)-----	62
Figura 17.	Genotipo HOGA 2001-10-6 (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C)-----	62
Figura 18.	Genotipo HOGA 2004-12-MS-6 (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C)-----	62
Figura 19.	Genotipo HOGA 2002-53-MS-6 (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C)-----	62
Figura 20.	Genotipo HOGA 2006-51-16 (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C)-----	62
Figura 21.	Genotipo HOGA 98-6-1 (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C)-----	63
Figura 22.	Genotipo HOGA 48-15 (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C)-----	63
Figura 23.	Genotipo HOGA 2002-13-1 (B) comparado con los testigos	63

	resistente (A) y susceptible (C)-----	
Figura 24.	Genotipo HOGA 98-7-3 (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C)-----	63
Figura 25.	Genotipo HOGA 22-MS (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C)-----	63
Figura 26.	Genotipo HOGA 23-MS-7 (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C)-----	63
Figura 27.	Genotipo HOGA 021 (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C)-----	64
Figura 28.	Genotipo HOGA 067 (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C)-----	64
Figura 29.	Genotipo HOGA 2001-2-2 (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C)-----	64
Figura 30.	Genotipo HOGA 2002-6-3 (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C)-----	64
Figura 31.	Genotipo HOGA 2002-40-6 (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C)-----	64
Figura 32.	Genotipo HOGA 2001-4-4 (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C)-----	64
Figura 33.	Genotipo HOGA 2000-8-1 (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C)-----	65
Figura 34.	Genotipo HOGA 2004-20-6 (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C)-----	65

Figura 35.	Genotipo HOGA 2001-10-6 (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C)-----	65
Figura 36.	Genotipo HOGA 2004-12-MS-6 (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C)-----	65
Figura 37.	Genotipo HOGA 2002-53-MS-6 (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C)-----	65
Figura 38.	Genotipo HOGA 2006-51-16 (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C)-----	65
Figura 39.	Genotipo HOGA 98-6-1 (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C)-----	66
Figura 40.	Genotipo HOGA 48-15 (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C)-----	66
Figura 41.	Genotipo HOGA 2002-13-1 (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C)-----	66
Figura 42.	Genotipo HOGA 98-7-3 (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C)-----	66
Figura 43.	Genotipo HOGA 22-MS (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C)-----	66
Figura 44.	Genotipo HOGA 23-MS-7 (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C)-----	66

RESUMEN

El garbanzo es uno de los cultivos principales en México, el estado de Sonora ocupa en segundo lugar en producción. Sin embargo su producción se ve afectada por enfermedades de origen fúngico, dentro de las cuales destaca *Fusarium solani*, que causa pudrición radicular y *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* causando amarillez y marchitez vascular. El objetivo de este trabajo fue determinar que genotipos de garbanzo generados en Sonora son resistentes a *Fusarium solani* y raza 5 de *Foc*. En el periodo 2011-2012, se colectaron plantas con síntomas de marchitez en diferentes localidades del Valle de Culiacán con el fin de aislar el patógeno, cortando pequeños trozos de las plantas infectadas y fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 3% y etanol al 70 %, posteriormente lavados con agua estéril, los cuales fueron sembrados y crecidos en medio PDA suplementado con PCNB y cloranfenicol a 25 °C durante 5 días. Ya desarrollado se aislaron y purificaron los cultivos monospóricos mediante diluciones seriadas, a los cuales se identificó mediante características morfológicas, se le extrajo el ADN para la identificación molecular mediante PCR de la raza 5. La cepa de *Fusarium solani* fue usada mediante el cepario de *Fusaria* del INIFAP, estos dos patógenos fueron usados para el análisis de la resistencia o susceptibilidad a genotipos de garbanzo mediante inoculaciones artificiales, bajo condiciones de invernadero. El resultado de este trabajo fue que de los 18 genotipos evaluados, el 94.4 % fueron resistentes a *Fusarium solani* y a la raza 5 de *Foc*.

ABSTRAC

Chickpea is one of the main crops in Mexico, Sonora ranks second in output. However production is affected by fungal diseases, among which stands *Fusarium solani*, which causes root rot and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* causing yellowing and wilting. The aim of this study was to determine that chickpea genotypes generated in Sonora are resistant to *Fusarium solani* and race 5. In the period 2011-2012, were collected plants with wilt symptoms in different parts of Culiacan Valley in order to isolate the pathogen, cutting small pieces of infected plants and were disinfected with sodium hypochlorite 3% and ethanol 70 %, then washed in sterile water, which were sown and grown in PDA medium supplemented with PCNB and chloramphenicol at 25 ° C for 5 days. Already developed were isolated and purified monospores cultures through serial dilutions, to which was identified by morphological characteristics, is extracted DNA for PCR screening of molecular race 5. *Fusarium solani* strain was used by *Fusaria* strain collection of INIFAP, these two pathogens were used for analysis of the susceptibility or resistance chickpea genotypes by artificial inoculation, under greenhouse conditions. The result of this work was that of the 18 genotypes evaluated, 94.4% were resistant to *Fusarium solani* and race 5 of *Foc*.

I.INTRODUCCIÓN

Entre las leguminosas de grano seco, el garbanzo (*Cicer arietinum* L.) ocupa el segundo lugar en importancia en nuestro país después del frijol, cultivándose dos tipos de este grano: el Desi (porquero), que se produce en el centro del país, y el Kabuli (blanco), que se cultiva principalmente en el Noroeste de México y es de gran importancia económica debido a que su producción se destina para la exportación al mercado internacional por lo que es un generador de divisas para el país y el estado de Sonora.

El Estado de Sonora, es el segundo productor de garbanzo, con 60 mil toneladas, que representa el 28 % del total del Noroeste de México. De esto, 90 % se exporta a España, Argelia, Italia, prevaleciendo en un 90% el cultivo de garbanzo blanco; sin embargo, es altamente susceptible a enfermedades. Dentro de las que sobresalen por su importancia son las causadas por hongos como: *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, *Rhizoctonia solani*, *F. solani*, *Macrophomina phaseolina* y *Sclerotium rolfsii*. Estos hongos sobreviven en el suelo, causan pudriciones de raíz y enfermedades vasculares, logrando impactar en el rendimiento entre un 10 y 60 %, y en ocasiones hasta el 100%. Además de ser uno de los principales factores que limitan la producción de garbanzo en el estado, ocasionando muy bajos rendimientos por hectárea y calidad de grano, con incidencias de 1 a 100% y alto grado de severidad.

Fusarium oxysporum f. sp. *ciceris* (*Foc*) ocasiona en las hojas del cultivo una decoloración verde grisácea, seguida de un amarillamiento o defoliación y la

marchitez parcial o total de la planta. El hongo ataca principalmente e impide principalmente la circulación de la savia por los vasos leñosos de las raíces y tallo, los cuales se tornan de color café a rojizo oscuro. En las plantas enfermas se puede observar necrosis en la raíz principal, en las raíces laterales y en el cuello del tallo. Ha sido una enfermedad causante de fuertes daños a la producción de este cultivo y difícil de erradicar.

II. ANTECEDENTES

Las enfermedades en plantas ocasionadas por *Fusarium*, han tenido gran impacto sobre los principales cultivos tanto que la mayoría de ellos presenta una enfermedad asociada a su presencia. Una revisión reciente de la lista de enfermedades gestionadas por la Sociedad Americana de Fitopatología, reveló que más de 81 de las 101 plantas de importancia económica en la lista tenían al menos una enfermedad asociada a *Fusarium*. Los tipos de enfermedades inducidas son muy variadas así como su gravedad y pueden incluir pudrición de tallo y raíz, chancros, marchitez, pudrición de fruto o semilla y enfermedades de las hojas, por tanto la identificación de las cepas de *Fusarium* presentes en plantas enfermas ha sido y sigue siendo una tarea importante en los laboratorios de diagnóstico, ya que juega un papel importante para la búsqueda de fuentes de resistencia (APS, 2004).

A pesar de su importancia económica, la productividad de garbanzo no ha mejorado considerablemente a lo largo de los años. Uno de los principales obstáculos para la realización del pleno rendimiento potencial de garbanzo es por la pudrición radicular causada por el hongo patógeno *Fusarium solani*. La enfermedad está muy extendida en el cultivo del garbanzo en el mundo al menos 33 países (Dubey *et al.*, 2007).

III. JUSTIFICACIÓN

México destaca entre los primeros lugares a nivel mundial en producción de garbanzo, pero su rendimiento se ve afectado desde hace décadas por problemas de origen fúngico, entre ellos *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, lo que ocasiona hasta un 40% de pérdidas en cuanto a rendimiento, por lo que es de suma importancia realizar una búsqueda de fuentes de resistencia en genotipos de garbanzo a la pudrición radicular y fusariosis vascular. El desarrollo de plantas con resistencia genética ofrece la mejor estrategia práctica y económica para el manejo de la enfermedad.

IV. HIPÓTESIS

En los genotipos de garbanzo generados en Sonora, existen materiales resistentes a *Fusarium solani* y a raza 5 de *Foc*.

V. OBJETIVO

Determinar que genotipos de garbanzo generados en Sonora son resistentes a *Fusarium solani* y raza 5 de *Foc*.

VI. REVISION DE LITERATURA

6.1 Origen y distribución del garbanzo

El nombre *Cicer* es de origen latino, derivado de la palabra preindogermana *kickere* usada por antiguas tribus del norte de Grecia y *arietinum* que tal vez corresponda a la traducción del griego *krios* que significa carnero, aludiendo a la forma de la semilla de cabeza de carnero (aries). El género *Cicer* es originario del suroeste de Turquía de la zona colindante con Siria, pero Vavilov establece dos centros primarios, el suroeste de Asia y la cuenca del Mediterráneo (De Miguel, 1991).

En el siglo XVI los españoles y portugueses, introducen el garbanzo a Sudamérica y América Central, encontrando principalmente en México (Sinaloa, Sonora y Baja California en la zona Norte, Michoacán, Guanajuato y Querétaro en la zona del Bajío) condiciones favorables para su producción. Que dentro de estas regiones Sinaloa es líder tanto en producción como en calidad (INIFAP, 2013), y hasta hace pocos años ha experimentado un desarrollo en el sur de E.U. (De Miguel, 1991).

6.2 Taxonomía del garbanzo

El garbanzo es una herbácea de la familia de las leguminosas, tiene hojas imparipinadas, flores axilares, solitarias y pedunculadas, de color blanco a violáceo y vainas que encierran dos semillas generalmente. Alcanza unos 60 cm de altura y las semillas tienen forma esférica, debido al grosor de los cotiledones que la forman.

Su clasificación taxonómica la ubica en la familia Fabaceae, subfamilia Papiilionoideae, tribu *Cicereae* y una docena de especies de las cuales *C. arietinum* L. es la más importante en el ámbito comercial, reconociéndose dos variedades botánicas *C. arietinum* var. *fuscus* o *vulgare* de flores violeáceas o rosadas y semillas de color castaño rojizo, que corresponden al tipo forrajero; y *C. arietinum* var. *Macrocarpum* de flores blancas y semillas de color claro para el garbanzo blanco que se designa al consumo humano (Mateo, 1961).

El género contiene plantas anuales y perenes de tallos ramificados, erectos o rastreros y las flores varían de color blanco, verdoso, rosa, violeta o azul. En ocasiones de 1 a 5 flores pueden estar dispuestas en racimos, pero por general habrá de 1-3 semillas. El ciclo varía de 90 a 180 días según las condiciones climáticas, se ubica dentro del grupo de plantas de día largo, con temperaturas de 15-25°C, soportando la mínima de -13°C y máxima de 33°C; además es bastante sensible a la falta de aeración (Mateo, 1961).

6.3 El cultivo de garbanzo en México

La introducción del garbanzo en México, Chile, Perú y Argentina es un evento reciente (Duke, 1981) se sabe que fue incorporado en América en el siglo XVI por los españoles y portugueses, encontrando en México, principalmente en la Región del Noroeste condiciones favorables para su producción. En su historial, este grano se empezó a cultivar en Sinaloa hace más de 400 años, el cual, fue introducido por sacerdotes jesuitas acompañantes de los españoles que colonizaron la región, habiendo iniciado su cultivo en la jurisdicción de la entonces conocida como Villa de Guasave, donde se utilizó para autoconsumo de los

propios españoles, de ellos aprendieron los nativos algunas formas de consumo (Sánchez-Montoya, 2013), actualmente ha sido fundamental en la economía de la región, tanto por la participación de un importante segmento de la población dedicada a las labores de campo, ya que es uno de los pocos cultivos rentables en las zonas temporaleras.

6.3.1. Variedades de garbanzo generadas en el Noroeste de México

El Programa de Mejora Genética del Garbanzo, llevado a cabo por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, en los Campos Experimentales Valle de Culiacán, Valle del Fuerte y Costa de Hermosillo, por más de cuatro décadas y hasta la fecha, han generado más de 20 variedades de garbanzo con gran calidad y productividad, que se han reflejado debido al rendimiento, porcentaje de exportación, calibre de exportación y resistencia genética a diversas enfermedades fúngicas. Estas variedades han sido certificadas ante el Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS-SAGARPA, 2010) y que considerando el objetivo de la certificación, procedimiento por el cual se asegura que la semilla cumple con los factores y niveles de calidad establecidos en las reglas técnicas, se requiere contar además con otros elementos que permitan garantizar la identidad de las variedades cuya semilla se pretende certificar, para lo cual se ha establecido un procedimiento para la descripción de las variedades, conforme estándares internacionales que permita distinguir y caracterizar una población de plantas que constituyen una variedad.

Diferentes variedades de garbanzo se diferencian entre sí debido, a su origen (cruzas), lo que se ve reflejado en su descripción o etapas fenológicas, tal es el caso del ciclo (fecha de floración, madurez fisiológica), tipo de planta (E=erecta,

SE=semierecta y SR=semiramificada, tamaño, hojas, flores, cápsulas y grano), las cuales varían en cuanto al clima, tipo de suelo y el manejo agronómico. Algunas de las variedades generadas han sido muy conocidas a nivel mundial, ya que varias de ellas han sido evaluadas en diferentes países a la resistencia en *Fusarium* spp., como es el caso de Surutato (Bhatti y Kraft, 1992; Jiménez-Díaz y Trapero-Casas, 1990), Gavilán y Tubutama (Jiménez-Díaz y Trapero-Casas, 1990). Los estados de Sinaloa, Sonora y BCS, son los únicos en México que cultivan este grano para su alimentación y exportación, siendo Sinaloa el estado con mayor área de superficie de siembra (79,750 ha), posteriormente le sigue Sonora (24,821 ha) y BCS (4,228 ha). En el Cuadro 1, se describen las superficies de siembra (ha) y rendimiento ($t\ ha^{-1}$), durante los periodos otoño-invierno de 2012-2013 en la Región del Noroeste de México.

Entre las de variedades de garbanzo que se han generado, destacan Blanco Sinaloa-92 (BS-92) (Gómez-Garza, 1993) y Blanoro 2010 (Ortega-Murrieta *et al.*, 2013), las cuales presentan un gran porcentaje de rendimiento, excelente calidad en calibre (semillas/30 gr) y multiresistencia genética a la fusariosis. Durante los periodos 2007- 2010, BS-92 y HOGA-012 (Blanoro 2010) fueron evaluadas en 28 localidades en terrenos de agricultores cooperantes que comprendían áreas del Valle de Fuerte, Valle de Culiacán, Valle del Yaqui, Valle del Mayo, Costa de Hermosillo y en el Valle de Santo Domingo (BCS), obteniendo como resultados que Blanoro obtuvo un rendimiento promedio anual de 2878 kg/ha y BS-92 generó 2694 kg/ha (Ortega-Murrieta *et al.*, 2013).

Cuadro 1. Superficie de siembra y rendimiento del garbanzo (otoño-invierno) en el periodo 2012/2013 en la región del Noroeste de México.

Estado	Superficie de siembra (ha)	Rendimiento obtenido Producción (t ha⁻¹)
Sinaloa	79,750	1.4
Sonora	24,821	2.6
B. C. S	4,228	3.4
TOTAL	108,799	7.4

SAGARPA, 2013.

6.3.2. Cultivo de garbanzo en Sonora

En Sonora resultados experimentales indican que la fecha óptima de siembra está comprendida del 15 de noviembre al 15 de diciembre (García, 1977). El estado de Sonora, es el segundo productor de garbanzo (Sánchez, 2002). La producción se exporta a España, Estados Unidos, Italia, Argelia y otros países, dedicándose al mercado nacional solo de 10 a 20 % de la cosecha, siendo un importante generador de divisas para el estado y el país (Morales et al., 1997).

Son diversas las variedades de garbanzo que se cultivan en el estado de Sonora. En el Campo Experimental Costa de Hermosillo se generaron 8 variedades de garbanzo (Programa de mejoramiento genético del garbanzo-INIFAP).

A continuación se describen algunas variedades de garbanzo generadas en Sonora (Cuadro 2), en cuanto a sus características fenológicas, ciclo, así como porcentaje de exportación y calibre.

Cuadro 2. Variedades de garbanzo generadas en el Campo Experimental Costa de Hermosillo, Sonora, (INIFAP).

Variedad	Hábito	Madurez fisiológica (días)	Porcentaje de exportación	Calibre de Exportación
Tubutama-88	SE	147	86	47
Pitic-93	E	156	88	56
Bco.Magdalena-95	E	154	86	54
Hermosillo-93	E	157	88	52
Desierto-98	SE	149	86	46
Tequi-98	SE	158	88	46
Costa-2004	E	150	94	46
Blanoro-2010	SE	135	93	45

E (Erecto), SE (semi erecto) y SR (semiramificado).

Fuente: INIFAP.

A continuación se describen algunas variedades generadas en Sonora:

Hermosillo 93. Variedad lechoso, es de ciclo semi-precoz alrededor de 157 días, el porte de la planta es erecto con una altura de 50 a 60 cm, grano redondeado, color café claro de tamaño mediano con 88% de grano para exportación calibre 52, con rendimiento de 2.0 a 2.8 t ha⁻¹.

Pitic 93. Variedad lechosa, de hoja compuesta, con foliolos acerrados de tamaño mediano, el porte de planta es erecto, con altura de 54 cm, grano café de tamaño mediano a chico, redondeado, con calibre de 54-60 semillas por 30gr, ideal para enlatado, produce de 2.5 a 2.8 t ha⁻¹.

Blanco Magdalena 95. Variedad lechoso, de hoja compuesta, con foliolos acerrados de tamaño mediano, follaje color verde claro, el porte de planta es erecto, con la altura de 54 cm, grano blanco de tamaño mediano, redondeado, con calibre de 52 a 56 semillas por 30 gr, ideal para enlatado, produce de 2.5 hasta 3.0 t ha⁻¹.

Tequi Blanco 98. Variedad lechoso, de hoja compuesta, foliolos acerrados de tamaño mediano y grano de color blanco, rugoso y redondeado, de ciclo tardío, tolerante a rabia, con porte de planta semierecto, altura de la planta es de 50 a 60 cm, tiene buena respuesta a riegos de auxilio produciendo mayor rendimiento de 2.0 a 3.0 t ha⁻¹.

Desierto 98. Variedad lechoso, es de hoja simple y grano grande de color café claro, rugoso y redondeado, de ciclo tardío. El porte de planta es semirastrero, la altura de planta es de 40 a 50 cm, las primeras flores se presentan entre 50 y 70 días, es de ciclo intermedio tardío, alcanza la madurez de 150 a 170 días a partir de la siembra, posee diferentes calibres (grande, mediano y chico). Produce de 2.0 a 2.8 t ha⁻¹.

6.3.3. Panorama del cultivo del garbanzo a nivel mundial

Entre las legumbres, el garbanzo ocupa el segundo lugar en superficie cultivada y el tercero en producción a nivel mundial. Este grano se cultiva y se consume, en su mayor parte en los países en desarrollo. Es una de las legumbres secas comestibles con mayor contenido nutritivo y no contiene ningún factor tóxico o anti-nutricional específico (encontrados con frecuencia en otras leguminosas). La semilla contiene, en promedio 23% de proteína; este cultivo satisface un 80% de su requerimiento de nitrógeno a partir de la fijación mutualista de este elemento.

En cuanto a producción de este grano en el periodo 2012-2013, México ocupó el sexto lugar a nivel mundial, siendo la India el principal productor (Cuadro 3).

Cuadro 3. Estadísticas de producción (ton) de garbanzo por países en el periodo 2012-2013.

País	Posición mundial	Producción (ton)
India	1	1,000, 100
Turquía	2	675,000
Canadá	4	317,000
Estados Unidos	4	122,000
Australia	5	117,000
México	6	108,799
España	7	76,000
Argentina	8	37,000

Fuente: FAOSTAT, 2013.

En cuanto a exportación del garbanzo en el mismo periodo, nuestro país ocupó el tercer lugar a nivel mundial, superado por Turquía y Australia respectivamente (Cuadro 4).

Cuadro 4. Estadísticas de exportación (ton) de garbanzo por países en el periodo 2012-2013.

País	Posición mundial	Exportación (ton)
Turquía	1	189,600
Australia	2	144,074
México	3	141,382
Canadá	4	94,063
Irán	5	87,111
Birmania	6	73,252

Continúa...

Tanzania	7	27,226
Estados Unidos	8	14,872
Rusia	9	14,829
Marruecos	10	12,281

Fuente: FAOSTAT, 2013.

6.3.4. Aspectos fitosanitarios del cultivo

Dentro de los factores limitantes en la producción del garbanzo, la fitosanidad es un aspecto muy importante, ya que se han reportado hongos, bacterias, virus y nematodos que le atacan en campo; además de insectos plagas como gusanos trozadores, minador de la hoja, gusano soldado y gusano de cápsula.

Aunado a la vasculariosis del garbanzo generada por *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (*Foc*) y la pudrición radicular ocasionada por *F. solani* (Fierros-Leyva et al., 2013, Velarde-Félix et al., 2013, Trapero- Casas y Jiménez- Díaz, 1985), existen otros hongos que invaden la raíz de la planta, causando una pudrición radicular, destacando, *Pythium aphanidermatum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, (Abdullah, 2010), *Rhizoctonia solani* Kühn (García-Estrada et al., 2004, Hwang, S. F., 2003) *Sclerotium rolfsii* Sacc (Hameeda et al., 2010, García-Estrada et al., 2004) *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. (Reznikov et al., 2013, Siddiqui y Akhtar, 2007, Trapero-Casas y Jiménez- Díaz, 1985), *Thielaviopsis basicola* (Berk y Broome) Ferraris (teleomorfo= *Chalara elegans* Nag Raj & Kendrick) (Bhatti y Kraft, 1992). Estos hongos están presentes durante todo el ciclo, pero pueden manifestarse en alguna etapa importante en la devastación en cuanto a la productividad y rendimiento de este cultivo a nivel mundial.

Otros daños fúngicos que causan enfermedades en el garbanzo, son las del tipo foliar, causadas principalmente por hongos diferentes, entre los cuales sobresalen: el moho gris (*Botrytis cinerea* Pers. ex. P.) (Wen et al., 2005), el Mildiú (*Peronospora ciceris* Agarwal), (Fierro-Corrales et al., 2011), la roya (*Uromyces ciceris-arietini* (Grognot) Jacz y Boyd, Cárdenas y et al., Stuteville et al., 2010) y la verdadera rabia del garbanzo generada por *Ascochita rabiae* (teleomorfo=*Didymella rabiei*) (Ali et al., 2012; Gan et al., 2006; Wen et al., 2005; Pande et al., 2005; Jiménez-Díaz et al., 1993; Trapero-Casas et al., 1992), aún no reportada en México. Estos hongos causan enfermedades económicamente importante en el garbanzo, y han sido encontradas en áreas especialmente con clima húmedo persiste.

Especies de bacterias, insectos y nematodos que infectan al garbanzo han sido muy escasas en cuanto a su detección y presencia. La bacteriosis del garbanzo se ha detectado en pocos lugares del mundo, en Venezuela se determinó que la bacteria *Pseudomonas* spp., es un agente causal de la pudrición en este cultivo (Tineo et al., 1988), causando grandes pérdidas en su rendimiento.

En insectos, una de las plagas importantes del garbanzo la constituye el díptero minador *Liriomyza cicerina*, encontrada en la península Ibérica (Tormos y Garrido, 1991). En México se han reportado el gusano trozador (*Peridroma saucia* Hubner), minador de la hoja (*Liriomyza trifoli* Burgess), gusano soldado (*Spodoptera exigua* Hubner) y gusano de cápsula (*Helicoverpa zea* Boddie) y *H. virescens*, ocasionando defoliaciones severas cuando sus poblaciones son muy altas, si esto ocurre cuando el grano está en formación, el rendimiento y la calidad decrecen,

debido a que los granos no se desarrollan normalmente (Cortez-Mondaca y Pérez-Márquez, 2013).

En cuanto a nematodos, *Meloidogyne incognita* se tiene reportado en la India, disminuyendo la productividad y el rendimiento, debido a los daños que genera en las raíces y la reducción de estas (Bushra *et al.*, 2012), aunado a que se ha confirmado que este nematodo, realiza una simbiosis con varios hongos, especialmente *F. solani*, *Rhizoctonia solani* y *Macrophomina phaseolina* lo que genera una mayor rapidez reduciendo la cantidad de raíces y en la reducción del crecimiento (Asmaa *et al.*, 2007).

En cuanto a la virosis, en garbanzo, son pocas las enfermedades que se han detectado a nivel mundial. En 1970, Kaiser y Danesh (1970), reportaron en Irán, que los virus que causan la marchitez en el garbanzo son el Mosaico de la Alfalfa (AMV), el Mosaico de la Amarillez en Frijol (BYMV), el Mosaico de la Calabaza (CMV) y el Virus del enrollamiento del guisante (PLRV), llegando a disminuir un 20-30% de la cosecha en este cultivo, En EUA se tiene reportado al Virus de la excrescencia del guisante (PEMV), el cual es transmitido por áfidos causando manchas cloróticas, retraso en el crecimiento, enanismo y deformación del tejido de la hoja (Mark *et al.*, 1996).

Finalmente, otros de los problemas fitosanitarios que causan pérdidas en el rendimiento del garbanzo en México, son las malezas, las cuales compiten por los recursos que requiere el garbanzo para su desarrollo. Entre ellas sobresalen el quelite (*Amaranthus palmeri*), el chual (*Chenopodium album*), la verdolaga (*Portulaca oleracea*), el tomatillo (*Physalis* spp.), el girasol (*Helianthus annuus*), la chinita (*Sonchus* spp.). Sin embargo, estudios para el combate de malezas con

base a herbicidas no han podido controlar especies tales como *Sysimbrium irio*, *Brassica campestris* (nabo silvestre), *Lactuca serriola* (lechugilla) y *Melilotus albus*, que en conjunto pueden causar pérdidas de rendimiento de 900 kg de grano por hectárea (Martínez, 2004).

6.3.5. Cultivares resistentes del garbanzo como uso del control a la fusariosis

La ecología del patógeno y la epidemiología de la enfermedad indican que las patologías de la fusariosis del garbanzo son de naturaleza monocíclica. Por tanto, la reducción de la cantidad del inóculo inicial en el suelo, a reducir su eficacia, o a ambas, es la estrategia más adecuada para su control. Por otra parte, la rotación de garbanzo con cultivos no huéspedes puede contribuir a reducir el inóculo de sus patógenos que residen en el suelo. Sin embargo, el control de la fusariosis mediante la rotación de cultivos no es efectivo debido a la capacidad del patógeno de sobrevivir prolongadamente en el suelo mediante clamidosporas, así como de infectar asintóticamente otros cultivos de plantas leguminosas y no leguminosas (Trapero Casas y Jiménez Díaz, 1985).

De forma similar, investigaciones sobre el uso combinado de fungicidas en semilla de garbanzo de diferente susceptibilidad, indican que algunos fungicidas incrementan significativamente la emergencia de las plántulas y retrasan el comienzo de las enfermedades en cultivares moderadamente resistentes, pero no en cultivares altamente susceptibles como el caso de la línea P-2245. Sin embargo, ningún tratamiento fungicida proporciona un nivel de control satisfactorio de la epidemia (Jiménez Díaz y Trapero Casas, 1985).

El método más práctico y económicamente eficiente para el control de la fusariosis es la generación y utilización de cultivares resistentes (Nene y Reddy, 1987). Sin embargo, la efectividad de este método de control puede ser disminuida por la existencia de razas patogénicas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (Jiménez Díaz *et al.*, 1993a; 1989b; Haware y Nene, 1982b). Como en otros patosistemas, el desarrollo de genotipos de garbanzo resistentes a esta enfermedad puede ser influido por factores como la genética de la resistencia en la planta y la variabilidad patogénica en el agente. Aun así, se han conseguido importantes avances en el desarrollo de genotipos de garbanzo resistentes o tolerantes a enfermedades individuales (Singh, 1987). Sin embargo, en muchos casos, el germoplasma resistente a una enfermedad se ha mostrado altamente susceptible a otras enfermedades importantes del cultivo.

Estudios realizados en condiciones de campo indicaron que la resistencia a fusariosis vascular en diferentes cultivares de garbanzo era monogénica con dominancia incompleta (Ayyar y Iyer, 1936), o monogénica y recesiva (Sidhu *et al.*, 1983; López, 1974). Otras investigaciones han mostrado que la resistencia a la raza 1 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en los germoplasmas CPS-1 y WR-315 es conferida por un único alelo recesivo, que se encuentra en el mismo locus en ambos genotipos de garbanzo (Kumar y Haware, 1982). Asimismo, Kumar y Haware (1982) sugirieron que en la resistencia a la raza 1A del patógeno pudieran estar implicados otros genes mayores o complejos poligénicos, y a que los cruzamientos realizados entre líneas susceptibles y resistentes de garbanzo no mostraban la relación fenotípica esperada de 3 (susceptible): 1 (resistente). Sin embargo, los progresos en la identificación de fuentes de resistencia y en el

desarrollo de cultivares de alto rendimiento y resistentes a la fusariosis han sido significativos (Singh, 1987; Singh y Reddy, 1991).

En el ICRISAT (Instituto de Investigación Internacional de Cultivos Tropicales Semiáridos) hay disponibles muchas líneas tanto del tipo Desi como del tipo Kabuli, resistentes a la fusariosis (Haware *et al.*, 1989a), así como otras fuentes de resistencia a la fusariosis vascular y a la podredumbre de raíz (Reddy *et al.*, 1990). Dicha resistencia a la fusariosis ha sido incorporada con éxito a cultivares de garbanzo tipos Desi y Kabuli de alto rendimiento (Kumar *et al.*, 1985; Ghanekar *et al.*, 1990).

6.3.6. Uso de marcadores moleculares del garbanzo como fuente de control de la fusariosis vascular

Otras de las alternativas que ha dado ventajas en el mejoramiento genético del garbanzo son las técnicas de biología molecular, ya que mediante su uso, basados en marcadores moleculares en el ADN genómico de este cultivo, se han podido encontrar genes con resistencia a ciertas razas patogénicas.

En una investigación realizada en Túnez, se determinó la herencia de la resistencia a la marchitez a la raza 0 en el garbanzo. Para ello se realizaron las cruzas de líneas endogámicas recombinantes (RILs) en dos F: 6, las cuales fueron generadas por CA2156 X JG62 (susceptible X resistente) y CA2139 X JG62 (resistente X resistente) y basado en marcadores moleculares tipo RAPDs, determinaron que la resistencia de garbanzo a la raza 0, está basada en un solo gen con dos alelos que controlan las resistencia a esta raza y que este gen está presente en JG-62, el progenitor resistente (Rubio *et al.*, 2003).

Otra investigación realizada en la India, el mapeo integrado de marcadores moleculares del genoma del garbanzo fue establecido con base en una cruce de líneas endogámicas resistentes al marchitamiento causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* de *C. arietinum* X *C. reticulatum*, el progenitor silvestre de garbanzo. Para ello, hicieron uso de marcadores moleculares tipo STMSs, Amplificación de ADN de huellas genómicas (DAF), polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLP), ISSR, RAPD, isoenzimas, ADN cloroplástico (ADNc), SCARs y loci, obteniendo como resultado la detección de genes del garbanzo para la resistencia a las razas fisiológicas 4 y 5 (la raza 4, solamente se han encontrado en la India). Estas técnicas dan como propuesta que sirven como una base para la selección de marcadores asistidos y la clonación basada en mapeo de genes de resistencia a la fusariosis y otros genes agronómicamente importantes en el futuro (Winter *et al.*, 2000).

6.4. El género *Fusarium*

El género *Fusarium* fue documentado por Link en 1809, y a casi tres siglos de su introducción se considera un género que contiene una alta diversidad de patógenos de plantas. Los miembros de este género, pueden provocar directamente enfermedades en plantas, animales domésticos y humanos. *Fusarium* spp. produce un grupo de metabolitos secundarios que están asociados con las enfermedades de las plantas, tal como el cáncer y otros defectos de crecimiento en humanos. Es un género con diversidad de especies, formas especiales y razas, aunado a metabolitos de gran importancia para la ciencia y la agricultura.

Las enfermedades en plantas por *Fusarium*, han tenido gran impacto sobre los principales cultivos, tanto que la mayoría de ellos presenta una enfermedad asociada a su presencia. Una revisión reciente de la lista de enfermedades gestionadas por la Sociedad Americana de Fitopatología (APS), reveló que más de 81 de las 101 plantas de importancia económica en la lista, presentan al menos una enfermedad asociada a *Fusarium*. Los tipos de enfermedades inducidas son muy variadas así como su gravedad y pueden incluir pudrición de tallo y raíz, chancros, marchitez, pudrición de fruto o semilla y enfermedades de las hojas, por tanto la identificación de las cepas de *Fusarium* presentes en plantas enfermas ha sido y sigue siendo una tarea importante en los laboratorios de diagnóstico (APS, 2014).

Las especies de hongos del género *Fusarium* han llamado la atención a un gran número de científicos a nivel mundial más que cualquier otro grupo de hongos, debido a que es un género cosmopolita y variable, responsable de numerosas enfermedades de plantas y animales, incluido el humano. Todas las especies del género son igualmente particulares como saprófitos y parásitos, encontrándose desde los trópicos hasta los círculos polares. Las especies de este género constituyen un grupo cosmopolita de hongos filamentosos que están ampliamente distribuidas en el suelo y que colonizan las partes aéreas y subterráneas de las plantas, así como residuos vegetales y otros sustratos orgánicos. Se considera un género de hongos fitopatógenos, ya que son capaces de infectar diversas especies vegetales y producir enfermedades, generando síntomas de amarillez, marchitez, pudrición radicular, chancros y finalmente la muerte de muchos cultivos, aunque también pueden vivir de manera saprófita sobre residuos de éstas

o en productos derivados de ellas (Leslie y Summerell, 2006). Debido a ello, provocan grandes pérdidas económicas en la agricultura y en la industria de procesado y transformación en alimentos y piensos debido a la disminución de su calidad (Marín, 2010).

6.4.1. Clasificación taxonómica del género *Fusarium*

Tradicionalmente, la identificación de hongos fitopatógenos se ha basado en la observación y comparación de caracteres morfológicos de los especímenes; sin embargo, en cada uno de los niveles taxonómicos, especie, subespecie, variedad, *formae specialis* y raza, cada vez es menos numeroso el tipo de caracteres morfológicos que se consideran válidos para la diferenciación entre dichos grupos. Además, mientras que subespecies y variedades suelen diferir en algunos aspectos morfológicos, *formas especiales* y razas difieren generalmente en la gama de especies y de cultivares de éstas, respectivamente, sobre las que son patogénicas (Coddington y Gould, 1992).

Los taxones reconocidos por el Código Internacional de Nomenclatura Botánica (ICBN por sus siglas en inglés), están basados en las características morfológicas de los individuos e incluyen sección, especie y variedades. Aunque algunas divisiones entre las especies de *Fusarium* están basados en la fisiología como las formas especiales y razas, o en genética como los grupos de compatibilidad vegetativa, no están reconocidos por el código.

Con base a los taxones documentados por el ICBN, la clasificación taxonómica de estos hongos es la siguiente:

Reino: Fungi

División Ascomycota

Subdivisión: Pezizomycotina

Clase: Sordariomycetes

Subclase: Hypocreomycetidae

Orden: Hypocreales

Familia: Hypocreaceae

Género: *Fusarium*

Algunas especies tienen un estado sexual (o teleomorfo) reconocido dentro de la familia Nectriaceae, y pertenecen a los géneros *Gibberella*, *Nectria* (*Haematonectria*) y *Albonectria* (Leslie y Summerell, 2006).

6.4.2. Descripción Filogenética de *Fusaria*

Actualmente, unas de las alternativas moleculares más frecuentes en el uso de la identificación filogenética de *Fusaria*, está basada en la secuencia nucleotídica del gen del factor de elongación 1 alfa (EF-1 α o TEF), el cual codifica una parte esencial de maquinaria de traducción proteínica, tiene una gran utilidad filogenética ya que es altamente conservado a nivel de especie dentro del género *Fusarium* y se han desarrollado cebadores o iniciadores universales que funcionan a través del género (Geiser *et al.*, 2004; Roger *et al.*, 1999), esto debido a que

presenta una sola copia no ortóloga para este género. Este gen fue utilizado por primera vez como marcador filogenético para inferir las especies y nivel de género entre los lepidópteros (Cho *et al.*, 1995). Para el caso de las especies del género *Fusarium*, estos cebadores fueron desarrollados para investigar linajes dentro del complejo *Fusarium oxysporum* (O' Donnell *et al.*, 1998).

Estos iniciadores amplifican una región de ~750 pb del gen EF flanqueando 3 intrones que constituyen la mitad de la longitud del amplificado en todos los *Fusarium* conocidos. Este gen es encontrado consistentemente en copia simple en *Fusaria* y muestra un alto nivel de polimorfismo, aun cuando es comparado con las porciones ricas en intrones de los genes que codifican proteínas como la calmodulina, β -tubulina e histona 3 (H3). Por estas razones EF se ha convertido en el marcador de elección como herramienta para la identificación de *Fusarium* spp. (Geiser *et al.*, 2004).

6.5. *Fusarium solani*

Un patógeno que ataca a un gran número de plantas y especialmente árboles. Este hongo tiene la facultad de reproducirse de dos formas: asexual (anamorfa) donde recibe el nombre de *Fusarium solani* (Martius) Appel & Wollenweber emend. Snyder & Hansen y de manera sexual (teleomorfo), denominándose con el nombre de *Haemanectria haematococca* (Berkeley & Broome) Samuel & Nirenberg. A diferencia de *F. oxysporum*, *F. solani* no es un hongo vascular por tanto su patología es de tipo de pudrición radicular.

6.5.1. Descripción morfológica

Las macroconidias son relativamente amplias, rectas, fuerte y robustos, con *morfología* celular apical redonda y la basal tiene una forma distinta o estar poco desarrolladas, directamente a casi cilíndrica, por lo general con una muesca o un extremo redondeado. Suelen ser abundantes en esporodoquias, con 5 a 7 septos.

Las microconidias, presentan septos ovales, elipsoides, reniformes y fusiformes, con 0 ó 1 y ocasionalmente 2 septos. Las células conidiógenas (fiálides), a menudo son bastante largas, con micelio abundante tipo aéreo.

Las clamidosporas, son abundantes y su formación se desarrolla abundante y rápidamente dentro de 2 a 4 semanas en medio CLA (Agar hoja de clavel) y su localización pueden estar intercaladamente en la hifa o formadas terminalmente en ramas laterales cortas o en pareja, pero ocasionalmente en cadenas cortas, su apariencia puede ser globosa u ovalada y lisa o paredes rugosas (Leslie y Summerell, 2006).

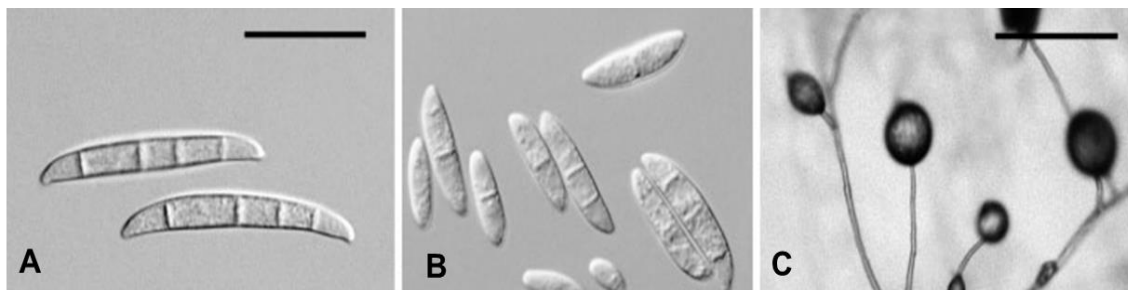


Figura 1. Morfología de *F. solani*: A) Macroconidias B) Microconidias C) Microconidias *in situ* en medio CLA.

6.5.2. Distribución geográfica y patogénesis

F. solani es un hongo cosmopolita, que ha sido encontrado aislado de suelos que involucran una gran variedad de ambiente (Burgess y Summerell, 1992). Este patógeno puede encontrarse en todo el mundo, aunque preferentemente en zonas templadas (Smith et al., 1988).

La presencia de *F. solani* está bien documentada como patógeno en un número de leguminosas y otras plantas tropicales, donde a menudo se asocia con chancros y problemas de muerte regresiva de árboles (Nelson *et al.*, 1981). Los mecanismos de patogenicidad en plantas han sido ampliamente estudiadas con *F. solani*, y se ha documentado que la bioquímica de la interacción hospedante-patógeno, por lo general se ha evaluado principalmente en términos de reacciones. Hay informes que este hongo puede eliminar compuestos antifúngicos sintetizados por algunas plantas hospederas, por ejemplo puede degradar a la α -tomatina, una fitoalexina sintetizada por el tomate (Lairini y Ruiz-Rubio, 1998).

La actividad de la quitina sintetasa, también se requiere para la plena expresión de algunos fenotipos patogénicos (Martin-Udiroz *et al.*, 2004). *F. solani* también pueden degradar fitoalexinas tales como kievitona que se producen como parte de la respuesta de las plantas a algunos ataques de hongos (Li et al., 1995).

La temperatura óptima del suelo para el desarrollo de la enfermedad causada por *F. solani* es de 26-28°C, el cual permanece como saprofito sobre restos vegetales descompuestos; las clamidosporas germinan en presencia de exudados radiculares de muchas plantas no huésped; en la rizosfera de los huéspedes puede haber una fase de crecimiento saprofítica anterior a la penetración del córtex de la raíz. La aireación del suelo induce la formación de clamidosporas

mientras que un suelo compactado favorece la invasión del huésped y el desarrollo de los síntomas. Se disemina por transporte de restos infectados y por el agua de drenaje (Smith *et al.*, 1988).

6.5.3. Sintomatología

Los síntomas comienzan en la zona basal por una decoloración del cuello que vira hacia el marrón claro; posteriormente, la planta se torna clorótica a causa de una podredumbre blanda. En la zona radicular se puede observar el descortezamiento de las raíces y raicillas. Una eflorescencia blanco a blanco cremosa se desarrolla sobre las lesiones, generando que la raíz y el córtex del hipocotilo ennegrezcan y se pudran, esto lleva a la clorosis foliar y a veces al enanismo generalizado de la planta (Smith *et al.*, 1988).

6.5.4. Reservorios de *Fusarium solani*

F. solani es un hongo de suelo, necrótrofo obligado, patogénicamente especializado de especies. Sin embargo, se sabe que este hongo puede invadir asintómicamente raíces de otras plantas, tanto leguminosas como no leguminosas, tales como: el chícharo (*Pisum sativum* L.), la lenteja (*Lens esculenta* Moench) el guandú (*Cajanus cajan* L.) Millsp.

Fusarium solani es una de las pocas especies de *Fusarium* que se puede encontrar en alta frecuencia en los suelos de la selva tropical. Algunas plantas de importancia económica considerable con enfermedades causadas por *F. solani* incluyen el aguacate, cítricos, leguminosas, la malanga, caupí, orquídeas, fruta de la pasión, pimientos, papa y calabaza. Las cepas de *F. solani*, a veces denominado *F. solani* f. sp. *glicina*, que causa muerte súbita (Leslie y Summerell, 2006).

F. solani se encuentra en todos sitios en el suelo y puede ser causante de caída de plántulas, podredumbre de pie y crancos de tallo en casi cualquier especie, también ataca tejidos heridos o debilitados o bien acompaña a otros patógenos como un invasor secundario.

6.5.5. Hospedantes

Fusarium solani puede encontrarse en muchas plantas hospedantes como: Citrus, Cucurbitacea, Ficus, Gladiolus, Glicyne, Gossypium, Lupinus, Lycopersicum, Morus, *Phaseolus*, *Pisum*, *Populus*, *Robina*, *Solanum*, *Trifolium* y *Vicia* (Smith *et al.*, 1988).

6.6. *Fusarium oxysporum*

F. oxysporum es la especie de este género más ampliamente distribuida y perjudicial a la agricultura, atacando cultivos de gran importancia económica. Sintomatológicamente las plantas enfermas muestran clorosis, achaparamiento, coloración marrón del xilema y comúnmente marchitez. Este hongo persiste en el suelo por lo que una vez establecido, permanece allí indefinidamente. A la fecha, se le considera como una especie de hongo estrictamente de reproducción asexual, ubicua en todo los ambientes edáficos del mundo (Leslie y Summerell, 2006). Este patógeno causa grandes daños en la productividad y rendimiento en numerosos cultivos agrícolas, y han sido clasificados en *formae specialis* con base a la patogenicidad hospedante-específica que manifiestan (Nelson *et al.*, 1981).

Generalmente, los aislados de *F. oxysporum* pertenecientes a una *formae specialis* son genéticamente más similares entre sí que a los aislados de la especie patogénicamente especializados sobre otros hospedantes, y por tanto, se

suele asumir que los aislados dentro de una *formae specialis* son evolutivamente de origen monofilético (Kistler, 1997; Tantaoui *et al.*, 1996).

6.6.1. Descripción morfológica

En la naturaleza existen hongos que rara vez se les ha encontrado su forma sexual de reproducción, por lo que se les ha denominado hongos imperfectos o Deuteromycetes; sin embargo, en algunos de ellos, bajo condiciones muy especiales se puede lograr la reproducción sexual obteniendo ascas o basidios, por lo que los hongos imperfectos suelen ser las fases conidiales de los Ascomycetes y raramente de los Basidiomycetes. Esto se debe a que ha perdido la capacidad de reproducción sexual; no obstante en la naturaleza, sobreviven sin necesidad de conidios de origen sexual. Por esta razón, los Deuteromycetes son una forma-clase que agrupa a estos. *F. oxysporum* pertenece a esta clase y está ubicado en el orden Hypocreales, que se reconocen por producir conidios en una estructura ramificada llamada conidióforos (Leslie y Summerell, 2006).

Para la identificación en cuanto a la especie *F. oxysporum*, se toman en cuenta las estructuras reproductoras. En general las conidias: macroconidias y microconidias las cuales son fusiformes o elipsoidales. Las macroconidias son escasas en algunas cepas y se forman en color naranja pálido y se producen en conidióforos ramificados con longitud de corto a media, son equilateralmente falcados o cilíndricamente puntiagudos, poseen paredes delgadas. La célula apical es corta y cónica, usualmente con 3 septos y se engancha ligeramente en algunos aislados, un poco curvos en el ápice y pedicelados en la base (Leslie y Summerell, 2006).

Las microconidias generalmente no poseen septas, puede ser oval, elíptica o reniforme, de color pálido, beige, azul, púrpura o marrón que se forman a partir de

conidióforos laterales cortos, generalmente en fiálides cortas en forma de cabezas falseadas agrupadas lateralmente, que miden de 5-12 x 2.2-3.3 μm (Leslie y Summerell, 2006).

El micelio es estriado, fibroso o velloso, con coloraciones que van del anaranjado al violeta (pero algunas cepas no presentan pigmentación); sin embargo, esas diferencias morfológicas entre cepas, son independientes de la agresividad y de su especialización en una u otra variedad de cultivo (Leslie y Summerell, 2006).

Las clamidosporas se forman abundantemente en hifas en la superficie del agar por la mayoría de los clones, especialmente saprófitas en aislados del suelo, pero pueden ser lentos (4-6 semanas) para formar en algunos aislados, las cuales poseen una apariencia lisa o rugosa (Leslie y Summerell, 2006). El hecho de que las clamidosporas sean estructuras de supervivencia de muchos *Fusaria*, persisten bajo condiciones térmicas bastante fuertes, sobreviviendo durante periodos largos y se ha determinado de que cuando está presente en suelos de cultivo, las clamidosporas germinan sólo en respuesta a nutrientes secretadas por las raíces de las plantas (Wollenweber y Reinking, 1935).

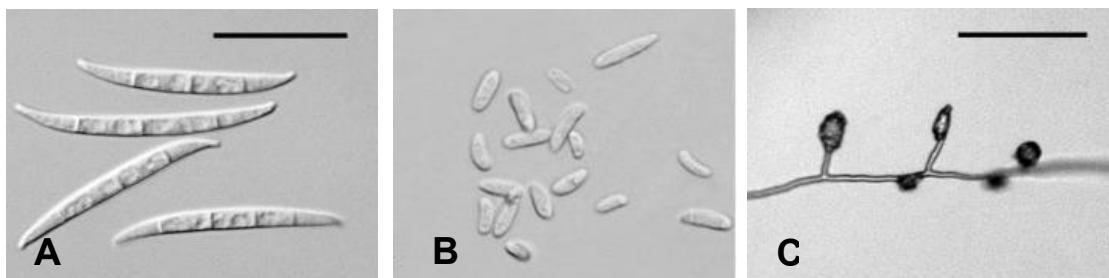


Figura 2. Morfología de *F. oxysporum*: A) Macroconidias B) Microconidias C) Microconidias *in situ* en medio CLA.

6.7. *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*

Fusarium oxysporum f. sp. *ciceris* (Padwick) Matuo & K. Sato (*Foc*), el agente causante de la fusariosis vascular del garbanzo (*Cice rarietinum* L.) se ha descrito en todas las zonas geográficas del mundo cultivadoras de esta leguminosa (Jalali y Chand, 1992). La marchitez del garbanzo causada por *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, se reportó por primera vez en la India. Aunque existen citas desde 1910 (Erwin, 1958) sobre una marchitez del garbanzo, el diagnóstico de esta enfermedad no se completó hasta 1940, en que Padwick (1940) identificó el agente causante al que entonces denominó como *F. orthoceras* var. *ciceri*.

Este hongo ocasiona en las hojas de la planta una decoloración verde grisácea, seguida de un amarillamiento y eventualmente ocurre la defoliación y la marchitez parcial o total de la planta. El hongo ataca la raíz de la planta e impide la circulación de la savia generando estrés hídrico, bloqueando los vasos de xilema, lo cual causa clorosis y necrosis (Di Pietro *et al.*, 2001; Gupta *et al.*, 2009). En las plantas enfermas se puede observar necrosis en la raíz principal, en las raíces laterales y en el cuello del tallo. Ha sido una enfermedad causante de fuertes daños a la producción del cultivo del garbanzo a nivel mundial (Kraft *et al.*, 1994) y la persistencia de este patógeno y su capacidad para sobrevivir durante varios años en ausencia del hospedante dificultan su control y su erradicación (Haware *et al.*, 1996).

Este hongo es ubicuo en suelos en donde se pueden observar formas tanto patogénicas como no patogénicas para la planta. Las formas patogénicas de este hongo pueden ocasionar pérdidas del rendimiento de un 10 a 15% en el garbanzo (Jalali y Chand, 1992). Debido a ello, la variación en cuanto a virulencia en

cultivares hospederos, pueden ser encontrados dentro de aislados de una forma especial, lo cual conduce a una designación de patotipos y razas patogénicas. Tomando esta consideración en particular, la caracterización fenotípica y genética de las variantes patogénicas de los patógenos de las plantas es requerida para un manejo eficiente de la enfermedad. *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, como agente de la marchitez del garbanzo, exhibe diversidad de síntomas. Dentro de esta diversidad, existen dos patotipos, la amarillez y la marchitez, los cuales han sido diferenciados por el síndrome que inducen en la planta en pruebas de patogenicidad y por la cronología con que estos se desarrollan (Navas *et al.*, 2007; Sharma y Muehlbauer, 2007; Sharma *et al.*, 2005; Navas *et al.*, 2000; Trapero Casas y Jiménez Díaz, 1985).

Ambos síndromes son consecuencia de infecciones vasculares de la planta y llevan asociada una coloración castaño oscura del xilema y médula de raíz, cuello y tallo resultado de la infección ocasionada por el hongo *Foc*, generalmente en inoculaciones artificiales las plantas mueren antes de los 30 días después de la siembra en suelo (Navas *et al.*, 2007; Sharma y Muehlbauer, 2007; Sharma *et al.*, 2005; Navas *et al.*, 2000, Trapero Casas y Jiménez Díaz, 1985).

En cuanto a la variación del tipo de síntoma, se encuentran ubicadas ocho razas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (razas 0, 1A, 1B/C, 2, 3, 4, 5 y 6), las cuales son identificadas con base en la respuesta de resistencia o susceptibilidad de las plantas, las cuales fueron consideradas como diferenciales, según el método de diferenciales del Centro Internacional para la Investigación Agrícola en Áreas Áridas (ICRISAT, Aleppo, Siria) propuesto por Haware y Nene (1982) y más recientemente por Jiménez *et al.*, (1993) y Sharma *et al.*, (2007). Las razas 0 y

1B/C inducen síntomas de amarillamiento (patotipo amarillez), mientras que las razas 1A, 2, 3, 4, 5 y 6, inducen síntomas de marchitez (patotipo marchitez) (Jiménez *et al.*, 1993).

Estudios basados mediante marcadores moleculares tipo ADN Polimórfico Amplificado al Azar (RAPD) determinaron que los dos patotipos también pueden ser diferenciados y se distribuyen en dos grupos diferentes mediante el análisis de “cluster” de los productos de amplificación de su ADN con iniciadores arbitrarios (Kelly *et al.*, 1994; Jiménez-Gasco *et al.*, 2001) lo que sugiere que podrían no encontrarse muy relacionados genéticamente. Al igual que ocurre con los patotipos, algunas de estas razas pueden ser diferenciadas mediante marcadores de ADN Polimórficos Amplificados Aleatoriamente (RAPD) (Jiménez Gasco *et al.*, 2001).

Sin embargo, estudios recientes basados en filogenia molecular, dirigidos a genes involucrados en la síntesis de metabolitos secundarios así como Secuencias Internas Transcripcionales (ITS), Fragmento de Longitud Polimórficos al Azar (RFLP), Secuencias Internas Simples Repetidas (ISSR), Fragmento de Polimorfismo de Longitud Amplificados (AFLP) y el Factor de Elongación de la Transcripción (TEF), mencionan que la raza 3 de *Foc* no existe y sugieren que el supuesto aislado de esta raza se encuentra filogenéticamente correlacionado con el hongo *Fusarium proliferatum*, el cual fue aislado en la India (Gayatri *et al.*, 2009).

Otra técnica de biología molecular basada para determinar la variabilidad genética de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* ha sido el AFLP. En un estudio realizado en la India mediante esta técnica, se determinó que los aislados patogénicos difieren en su

virulencia, confirmándose que estos aislados no presentaron una correlación entre el origen geográfico (Sharma *et al.*, 2009).

6.7.1. Distribución geográfica y patogénesis

La Fusariosis Vascular del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) causada por *Fusarium oxysporum* Schlechtend: Fr. f. sp. *ciceris* (Padwick) Matuo & K. Sato es, junto con la Pudrición Radicular causada por *Fusarium solani* (Martius) Appel & Wollenweber emend. Snyder & Hansen (teleomorfo=*Haemanectria haematococca* (Berkeley & Broome) Samuels & Nirenberg, la enfermedad más importante de las que afectan a la producción y rendimiento del garbanzo en el Noroeste de México (Fierros-Leyva *et al.*, 2013, Velarde-Félix *et al.*, 2013).

La enfermedad ha sido diagnosticada en la mayoría de los países donde se cultiva el garbanzo, entre los que se encuentran Bangladesh, Etiopía, México, Pakistán, Siria (Halila y Strange, 1996; Nene, 1980), India (Sharma *et al.*, 2009; Pande *et al.*, 2007; Winter *et al.*, 2000; Halila y Strange, 1996; Nene, 1980), Turquía (Bayraktar y Dolar, 2009), Túnez (Rubio *et al.*, 2003; Halila y Strange, 1996; Nene, 1980); Chile, Irán, Sudán (Haware *et al.*, 1986); Cuba (Dueñas-García *et al.*, 2007), Perú (Echandi,1970); Puerto Rico (Kaiser, 1981), Rusia (Stepanova, 1971); Malavi (Kannaiyan,1981); EUA (California) (Buddenhagen y Workneh, 1988; Phillips, 1988, Westerlund *et al.*, 1973); Polonia (Mazur *et al.*, 2004), Italia (Frisullo *et al.*, 1989), pudiendo originar pérdidas anuales de rendimiento de 10-90% en la India (Singh y Dahiya, 1973) y el 10-15% en España (Trapero-Casas y Jiménez-Díaz, 1985), y la devastación completa del cultivo en condiciones determinadas (Halila y Strange,1996).

En México son pocos los estudios relacionados con la variabilidad genética de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* mediante marcadores moleculares, y por tal motivo, estos resultados no han llegado a confirmar con certeza cuales son las razas fisiológicas que causan la fusariosis vascular del garbanzo (Luna-Páez *et al.*, 2004). Sin embargo, los investigadores del programa de mejora genética del garbanzo del INIFAP en Sinaloa, Sonora y Baja California Sur, basado en su experiencia en cuanto a la patogénesis de este hongo, mencionan que es más común los síntomas relacionados con la marchitez (Fierros-Leyva *et al.*, 2013; Velarde-Félix *et al.*, 2013).

6.7.2. Sintomatología

La fusariosis vascular del garbanzo se caracteriza por dos síndromes, denominados Amarillez y Marchitez, distinguibles entre sí tanto por los síntomas que los componen como por la cronología con que éstos se desarrollan. Ambos síndromes son consecuencia de infecciones vasculares de la planta y llevan asociada una coloración castaño oscura del xilema y médula de la raíz, cuello y tallo de las plantas infectadas.

El síndrome de amarillez se caracteriza por el desarrollo progresivo de clorosis, amarillez y necrosis de folíolos, que progresan de forma acrópeta en la planta dando lugar a la defoliación de ésta.

El síndrome de marchitez se caracteriza por un desarrollo rápido de flaccidez y clorosis verde mate en las hojas, en ausencia de amarillez, que se extiende poco después al resto de la planta. La flaccidez es seguida por la desecación de hojas y tallos, los folíolos permanecen adheridos al raquis, y posteriormente la planta muere. En inoculaciones artificiales mediante siembra en suelo infestado por el

patógeno, la muerte de plantas susceptibles ocurre generalmente antes de transcurridos los 20 días desde la siembra (Navas *et al.*, 2007; Sharma y Muehlbauer, 2007; Sharma *et al.*, 2005; Navas *et al.*, 2000; Trapero Casas y Jiménez Díaz, 1985).

Ambos síndromes han sido descritos en la literatura fitopatológica asociados con la fusariosis vascular del garbanzo, aunque el de Marchitez ha sido el más común y tradicionalmente reconocido en diversos países (Nene, 1980; Raheja y Das, 195).

En México, el síndrome de marchitez es el más predominante en la Región del Noroeste, donde se cultiva el garbanzo para su exportación, siendo el estado de Sinaloa, la región donde más se ha observado que en otras localidades (Fierros-Leyva *et al.*, 2013; Velarde-Félix *et al.*, 2013).

6.7.3. Reservorios de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*

F. oxysporum f. sp. *ciceris* es un hongo de suelo, necrótrofo obligado, patogénicamente especializado de especies de *Cicer*, a las que infecta vascularmente y transmisible en semillas de garbanzo infectadas (Nene y Haware; 1980; Haware *et al.*, 1978). Sin embargo, se sabe que este hongo puede invadir asintómicamente raíces de otras plantas, tanto leguminosas como no leguminosas, tales como: el chícharo (*Pisum sativum* L.), la lenteja (*Lens esculenta* Moench) el guandú (*Cajanus cajan* L.) Millsp. (Haware y Nene, 1982a), el lupín (*Lupinus albus* L.), la haba (*Vicia faba* L.), el frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), el melón (*Cucumis melo* L.), la papa (*Solanum tuberosum* L.), la remolacha azucarera (*Beta vulgaris* L.), el chual blanco (*Chenopodium álbum* L.), y la veza o arveja (*Vicia sativa* L.) (Cabrera de la Colina *et al.*, 1987; Trapero Casas y Jiménez

Díaz, 1985), que proporcionan al patógeno un medio de sobrevivir parasíticamente durante periodos de tiempo en que el suelo permanece libre de su hospedante cultivado. *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* al igual que los agentes causantes de otras fusariosis vasculares, posee la capacidad de sobrevivir inactivo en el suelo en forma de clamidosporas durante varios años en ausencia de plantas hospedantes (Allen,1983); hasta 6 años, según indican investigaciones realizadas en la India (Haware *et al.*, 1986b).

F. oxysporum f. sp. *ciceris* puede invadir las plántulas de garbanzo de cultivares tanto susceptibles como resistentes durante la germinación y emergencia, en los primeros días después de la siembra, sin necesidad de heridas en los tejidos subterráneos de la joven planta. La penetración de la planta por el patógeno tiene lugar principalmente a través de los cotiledones, y en las zonas del hipocótilo y epicótilo próximas a los cotiledones; y en menor proporción por zonas de la raíz principal, a excepción del ápice radical (Jiménez-Díaz *et al.*, 1989a). Posteriormente, y tras el crecimiento del hongo a través del córtex radical, tiene lugar la colonización vascular de la planta debido al crecimiento de las hifas a lo largo del eje vegetal y al transporte de microconidias en los vasos del xilema, seguido de la colonización de los vasos adyacentes debido al crecimiento lateral del micelio a través de los poros laterales de aquéllos. Inicialmente, la colonización vascular se produce mediante el crecimiento de hifas delgadas en la raíz y base del tallo de la plántula, desarrollándose las hifas gruesas irregulares y ramificadas cuyo crecimiento profuso da lugar a la oclusión del lumen de los vasos infectados (Jiménez-Díaz, 1994; Jiménez-Díaz *et al.*, 1989a). La colonización vascular de la planta ocurre en sí de forma similar por los aislados del patógeno que causan el

síndrome de amarillez y por los que causan la marchitez. Sin embargo, los aislados causantes de amarillez, menos virulentos que los de marchitez, invaden la planta más lentamente y con menor extensión. Para ambos tipos de aislados, los síntomas severos característicos se desarrollan después de la colonización intensa y extensa de los haces xilemáticos de la raíz y base del tallo por el hongo, y la distribución de éste a lo largo del eje de la planta (Jiménez-Díaz, 1994; Jiménez-Díaz *et al.*, 1989a).

Estudios fitopatológicos indican que el marchitamiento del garbanzo es debido a la semilla infestada y que cuando las semillas cosechadas de plantas con la enfermedad se mezclan con semillas sanas pueden transmitir el hongo del marchitamiento a áreas nuevas y pueden establecer la enfermedad en el suelo a niveles económicos umbrales dentro de tres temporadas (Westerlund *et al.*, 1973).

6.7.4. Variabilidad patogénica

Las poblaciones de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* contienen una variabilidad apreciable en lo concerniente a la capacidad patogénica de los aislados que las componen (Jiménez Díaz *et al.*, 1989a,b; Haware y Nene, 1982b). Por una parte, los aislados de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* pueden ser caracterizados en dos patotipos, por el síndrome de amarillez (patotipo de amarillez) o de marchitez (patotipo de marchitez) que inducen en cultivares de garbanzo susceptibles. Además, sobre la caracterización patotípica, los aislados pertenecientes a un patotipo pueden ser clasificados en razas patogénicas con base al patrón de reacciones que originan en un conjunto de cultivares o líneas denominados diferenciales raciales. La primera descripción de razas patogénicas en *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* es debida a Haware y Nene (1982b), quienes identificaron

las razas 1, 2, 3 y 4, según la interacción diferencial que obtuvieron al inocular 10 cultivares de garbanzo (Annigeri, BG-212, Chafa, C-104, CPS-1, JG-62, JG-74, K 8503/27, L-550 y WR-315) con aislados del patógeno procedentes de la India.

La correcta identificación de las variantes patogénicas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* presentes en una determinada zona de cultivo es un aspecto crucial con vistas a la utilización y desarrollo mediante mejora genética de cultivares con resistencia estable. De forma tradicional, la identificación de razas patogénicas en hongos fitopatógenos se ha llevado a cabo por el fenotipo de las interacciones planta-patógeno, en pruebas de patogenicidad basadas en la inoculación de líneas diferenciadoras de la planta hospedera con aislados del patógeno.

Estudios actuales hacen referencia que para estandarizar los criterios relacionados para clarificar plenamente cualquier inconsistencia y así facilitar una precisa identificación de las razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, es necesario estandarizar los criterios en la investigación. De tal forma, que para homogenizar el uso de un método a nivel internacional, basado en líneas resistentes y susceptibles, determinaron un juego de 10 plantas pregerminadas de líneas diferenciales para definir las razas de este patógeno, lo cual ha sido la base para los estudios de la caracterización molecular de este hongo. (Sharma y Muehlbauer, 2007; Sharma et al., 2005; Sharma et al., 2004).

6.8. Diferenciación entre *F. solani* y *F. oxysporum*

Muchos investigadores confunden a *F. solani* y *F. oxysporum*, ya que este desorden en algunos aspectos es debido a la morfología de ambos hongos, aunado a que estos ellos comparten los mismos nichos ecológicos. *F. solani* y *F. oxysporum* se pueden distinguir mediante el estudio de sus fiálides (conidiógeno).

La longitud de las fiálides que están en *F. solani* son más largas, con mas forma oval y gruesas comparadas con las de *F. oxysporum* (Van, 1976). Otra diferencia importante en estas especies, es que *F. solani* se reproduce de manera sexual formando ascosporas, mientras que *F. oxysporum* no presenta esta característica (Leslie y Summerell, 2006).

6.9. Métodos y Técnicas de biología molecular

6.9.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (acrónimo en inglés Polymerase Chain Reaction, PCR) consiste en una reacción *in vitro* que permite la amplificación de regiones específicas de ADN a gran escala y de manera simple y rápida. Se basa en la síntesis de una hebra complementaria de ADN a partir de una cadena simple que utiliza como molde, por medio de la sucesión de ciclos de diferentes temperaturas. Emplea secuencias nucleotídicas cortas como iniciadores de la síntesis (cebadores o primers) que se unen específicamente a las secuencias que flanquean la región a amplificar (región blanco). Además, esta reacción se desarrolla en presencia de una enzima ADN polimerasa bacteriana termoestable y cuatro deoxinucleótidos (dNTPs). El proceso requiere tres pasos básicos: 1) desnaturalización o separación de las cadenas del ADN; 2) hibridación o alineamiento de los iniciadores a sus secuencias complementarias, y 3) síntesis de la hebra complementaria a partir cada iniciador. Cuando este ciclo se repite sucesivas veces se produce un incremento exponencial de la región amplificada. Luego los productos de la reacción de PCR son analizados por electroforesis en un gel de agarosa o acrilamida (Heid *et al.*, 1996).

VII.- MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Colecta de plantas

Con el fin de aislar e identificar a *Fusarium oxysporum* mediante técnicas moleculares, en los cultivos de garbanzo (octubre-enero) en el periodo 2011-2012 en el Valle de Culiacán, se realizó un muestreo en el cual se recolectaron plantas enfermas con características típicas de la enfermedad como marchitez. El análisis se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Biotecnología del Campo Experimental Valle de Culiacán del INIFAP. Para la colecta de muestras se tomó en consideración un tiempo no mayor a los 40 días posteriores a la germinación de siembras comerciales.

7.2 Aislamiento, propagación y conservación de aislados monospóricos de *Fusarium*.

De cada planta con síntomas, se cortaron pequeños trozos longitudinales de 3 mm del tallo, que fueron desinfectados superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio al 2% por 2 min y etanol al 70 % por 2 min, seguido de tres lavados con agua destilada. Para el crecimiento y desarrollo del hongo, el tejido vegetal previamente desinfectado fue depositado en cajas de Petri con medio papa-dextrosa-agar (PDA-Difco) suplementado con 1.5 mL/L de PCNB (penta-cloro-nitro-benceno) y cloranfenicol (600 mg/L), incubándose a una temperatura de 25° C durante 5 días (Velarde-Felix *et al.*, 2003). La respectiva identificación del hongo se realizó en un microscopio compuesto (Olympus Cx31), con base a la morfología del micelio y microconidias en las fiálides propuestas por Leslie y Summerell (2006).

Para obtener cultivos monospóricos del *Fusarium* spp, se obtuvo micelio del hongo crecidos en medio PDA, el cual fue diluido en 1.0 mL de agua destilada y mediante un hemocitómetro se cuantificó el número de conidias y a través de diluciones seriadas fueron sembradas en cajas Petri con medio PDA, a partir de donde se obtuvo el cultivo monospórico. Los aislamientos se observaron al microscopio, ubicando esporas individuales germinadas; se marcó el sitio sobre el agar y un fragmento de este con la espора germinada y seleccionada se transfirió a una nueva caja de Petri con medio PDA suplementado con PCNB y cloranfenicol, incubándose en las mismas condiciones anteriormente mencionadas. Un pequeño trozo de medio PDA con el hongo desarrollado fue transferido a tubos de ensayo que contenían arena tamizada estéril (8 x 10 hilos/cm³) con medio líquido Komada (Komada, 1975) y fueron almacenados en un refrigerador con temperatura de 4°C para su preservación (Cuadro 5).

Cuadro 5. Medio de cultivo selectivo (Komada modificado) para aislar a *Fusarium* spp.

Reactivo	Cantidad
Agar	10g
Peptona de caseína	15g
K ₂ HPO ₄	1 g
MgSO ₄ -7H ₂ O	50 mg
Cloranfenicol	600 mg
PCNB	1.5 mL
Volumen final	1 L

7.3. Extracción de ADN de los cultivos monospóricos

Para la extracción del ADN, se empleó el método previamente descrito (Velarde-Félix *et al.*, 2013), para ello el micelio del hongo fue obtenido raspando con una asa bacteriológica estéril a partir del medio sólido, este fue colocado en mortero y pistilo de porcelana, los cuales fueron esterilizados durante 5 min en un horno de microondas electrodoméstico (LG, modelo MS-1446SQP/01, funcionando en la frecuencia de las microondas, en torno a los 2.45 GHz (Giga Hertz) y finalmente enfriados a -70°C. Después se agregó 1 mL de amortiguador de extracción que contenía: NaCl 30 mM, EDTA 30 mM y Tris Base 250 mM (pH 8.5), con el cual fue macerado. El producto de la maceración se colocó en tubos Eppendorf de 1.5 mL con su respectiva etiquetación. Enseguida se añadió a la muestra 100 µL de CTAB al 10% y 250 µL de NaCl 5 M incubándose a 65°C durante 30 min y, posteriormente fue centrifugada a 13,000 rpm durante 10 min y transcurrido este tiempo, la solución acuosa (sobrenadante) fue transferida manualmente a un tubo nuevo. A La solución acuosa se le añadió un volumen de cloroformo frío (v/v) y se agitó con un equipo de vortex durante unos seg, posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 min, y una vez transcurrido este tiempo, mediante pipeteo (manualmente) la solución acuosa fue transportada a un tubo nuevo (se tuvo mucho cuidado de no tocar la interfase con la pipeta), agregándosele un volumen isopropanol absoluto frío y agitándose manualmente. Posteriormente, las muestras fueron almacenadas en un equipo de refrigeración a -20°C durante una hora y así generar la precipitación del ADN. Ocurrido este tiempo, las muestras en tubos

fueron centrifugadas a 13,000 rpm durante 10 min para obtener la pastilla de ADN, para ello se esperó dos horas para que el ADN se deshidratara y finalmente el ADN obtenido de los diferentes aislamientos se resuspendieron en 50 μ L de agua libre de nucleasas (Promega) y almacenado a 4°C para su conservación.

7.4. Amplificación mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

El ADN extraído de las muestras correspondientes a *Fusarium oxysporum*, inicialmente fueron confirmadas por PCR mediante el método propuesto por Mishra *et al.*, (2003), tomando en consideración las secuencias de iniciadores, así como las temperaturas de cada uno de los pasos de amplificación. Las condiciones de amplificación para esta especie fueron: 1 ciclo a 95°C, 5 min; 30 ciclos (95°C, 1 min; 53°C, 1 min; 72°C, 1 min.) y un ciclo de extensión final a 72°C, 10 min y 4°C. Posteriormente para confirmar formas patogénicas de *Foc* y razas fisiológicas, este protocolo fue de acuerdo a las condiciones y secuencias de iniciadores descritas por Jiménez-Gasco y Jiménez-Díaz (2003).

Las condiciones de amplificación para aislados de *Foc* patogénico fueron las siguientes: 1 ciclo a 95°C, 5 min; 30 ciclos (95°C, 1 min; 58°C, 1 min; 72°C, 2 min;), un ciclo de extensión final a 72°C, 10 min. y 4°C), y las condiciones para razas específicas (0, 1A, 1B/C, 5 y 6) fueron: 1 ciclo a 95°C, 5 min; 30 ciclos (95°C, 1 min; 61°C, 2 min; 72°C, 2 min.), un ciclo de extensión final a 72°C, 10 min y 4°C. La mezcla de reacción final para todas las identificaciones fue de 15 μ L y contenía 100 ng de ADN, 250 μ M de dNTPs, 1.5 mM de MgCl₂, amortiguador de PCR 1X, 1 U de ADN Taq polimerasa, 40 pM de cada oligonucleótido (Alpha DNA). Los reactivos usados en las PCRs y el marcador de tamaño molecular para

determinar el tamaño del fragmento amplificado, fueron de la marca Fermentas y Bioline. Para todas las reacciones anteriormente mencionadas se utilizó un equipo termociclador (Nyx Technik Amplitronyx Series 6 A6 (ATC401) Thermo I Cycler). En el Cuadro 6, se describen las condiciones de temperaturas de alineamiento, secuencias de iniciadores para la identificación de *Fo*, *Foc* y raza 5.

7.5. Identificación de la raza fisiológicas 5

Cuadro 6. Condiciones de temperaturas de alineamiento y secuencias de iniciadores para la identificación de *Fo*, *Foc* y razas fisiológicas mediante PCR.

Secuencias de iniciadores 5'→3'	^{a)}T. de A	^{b)}pb	^{c)}Spp /f. sp./r
D: ACATACCACTTGTTGCCTCG R:CGCCAATCAATTTGAGGAACG	53 °	350	<i>Fo</i>
D:GGCGTTTCGCAGCCTTACAATGAAG R:GACTCCTTTTTCCCGAGGTAGGTCAGAT	58°	1500	<i>Foc</i>
D:GGAAGCTTGGCATGACATAC R:AAGCTTGGGCACCCTCTT	61°	900	R5

7.6. Análisis electroforético para la separación de los productos amplificados

Los productos amplificados fueron analizados en geles de agarosa al 1%, teñidos con una solución (Biotium (Bio Basic Inc), para ello 15 µL del ADN amplificado fueron depositados en cada pozo del gel, agregándosele 3 µL del colorante de azul de bromofenol 6X (Sambrook y Rusell, 2001) y como referencia los marcadores de peso molecular 1Kb Ladder (Fermentas) e Hyper Ladder IV (Bioline). La solución amortiguadora de corrida y preparación de los geles de agarosa fue NaOH-Borato 1X (Brody y Scott, 2004). El tiempo de corrida fue de 40 min a 150 V y para visualizar el ADN, el gel fue expuesto a un transiluminador de luz UV. Las imágenes fueron capturadas mediante una cámara fotográfica y digitalizados con el programa Launch Doc-ItLS (UVP).

7.7. Análisis de resistencia o susceptibilidad a *F. solani* y raza 5 de *Foc* en genotipos de garbanzo

Con la finalidad de evaluar la resistencia o susceptibilidad de los genotipos de garbanzo de Sonora a *F. solani* y raza 5 de *Foc*, se tomó en consideración la identificación previa mediante PCR de la raza 5, mientras que *F. solani* usada en este estudio fue mediante un aislado de un cepario del INIFAP-Culiacán, en donde esta cepa está registrada ante el NCBI con un número de acceso KJ501093.

Tomando en consideración lo reportado en la literatura, con respecto a la raza 5 y *F. solani*, se usaron como testigos las líneas diferenciales WR-315 y P-2245

determinadas como resistente (R) y susceptible respectivamente (S) (Trapero-Casas y Jiménez-Díaz, 1985) (Cuadro 7).

Las semillas de líneas diferenciales de garbanzo fueron obtenidas del banco de germoplasma de garbanzo del Campo Experimental Valle de Culiacán-INIFAP. Y los genotipos evaluados fueron proporcionados por la Campo Experimental Costa de Hermosillo-INIFAP. Para la preparación del inóculo del hongo, este fue crecido en medio PDA suplementado con PCNB y cloranfenicol durante una semana, a 25°C. De este medio, se cortaron ocho fragmentos de micelio y fueron depositados en un matraz con medio AMA (arena-harina de maíz-agua) e incubados bajo las mismas condiciones durante 15 días. La desinfestación de las semillas de garbanzo de cada uno de los genotipos, consistió en lavarlas en una solución de hipoclorito de sodio al 2.5% durante 3 min y posteriormente enjuagadas en agua destilada estéril y para su germinación, estas fueron depositadas en una autoclave a 25°C durante 48 h. Germinadas las semillas, fueron seleccionadas por uniformidad en tamaño, depositando 4 plántulas por macetas. Para la preparación de la tierra-sustrato, se realizó una mezcla de suelo franco-turba-medio AMA (con inóculo del hongo) y 600 g de esta mezcla fueron depositados en macetas previamente esterilizadas. La cantidad de inóculo para *F. solani* fue de 35,000 ufc/g de suelo y para la raza 5 fue de 40,000 ufc/g de suelo. El experimento fue realizado con base al protocolo de Navas-Cortés *et al.*, (2007), bajo invernadero a 25°C y un fotoperiodo de 12 h, el cual se realizó en tres repeticiones, incluidos los testigos sin inóculo. Las plantas fueron regadas con agua estéril cada 24 h durante todo el desarrollo del experimento y a partir de los 15 días después de la siembra las plantas fueron regadas semanalmente con 100

mL de solución nutritiva Hoagland (Hoagland y Amón, 1950). Después de los 15 días a partir de la siembra, cada tercer día se evaluaron las plantas para observar síntomas de pudrición y marchitez, usando un rango de escala conforme al porcentaje de enfermedad de la planta (1=1-33%, 2=34-66%, 3=67-100%), (Cuadro 8), (Navas-Cortés *et al.*, 2007; Jiménez-Díaz *et al.*, 1989b).

Cuadro 7. Lista de las líneas diferenciales de garbanzo seleccionadas como testigos y sus reacciones a *F. solani* y a la raza 5.

Línea diferencial	<i>F. solani</i>	Raza 5
WR-315	R (100)	R (100)
P-2245	S (100)	S (100)

Cuadro 8. Escala de puntuación de la enfermedad utilizado en las líneas diferenciales de garbanzo para la resistencia y susceptibilidad a *Fusarium solani* y a la raza 5.

No.	Rango de severidad	Síntoma
1	1-33%	Resistente
2	34-66%	Intermedia
3	67-100%	Susceptible

7.8. Planteamiento experimental

Se estudiaron 18 genotipos más dos testigos, resistente y susceptible respectivamente con relación a la resistencia o susceptibilidad:

Cuadro 9. Genotipos evaluados

Numero	Genotipo
1	HOGA 0-21
2	HOGA 0-67
3	HOGA 2001-2-2
4	HOGA 2002-6-3
5	HOGA 2002-40-6
6	HOGA 2001-4-4
7	HOGA 2000-8-1
8	HOGA 2004-20-6
9	HOGA 2001- 10-6
10	HOGA 2004 -12-MS-6
11	HOGA 2002- 53-6-MS
12	HOGA 2006-51-16
13	HOGA 98-6-1
14	HOGA 2006-48-15
15	HOGA 2002-13-1
16	HOGA 98-73
17	HOGA 22-MS
18	HOGA 23-MS-7

P-2245 Testigo susceptible.

WR-315 Testigo resistente.

Se estableció un experimento factorial 20 X 2, con los genotipos y patógenos siguientes:

Cuadro 10. Arreglo factorial de los genotipos.

Factor A: Genotipos		Factor B: Patógenos
1	HOGA 021	
2	HOGA 067	
3	HOGA 2001-2-2	
4	HOGA 2002-6-3	
5	HOGA 2002-40-6	
6	HOGA 2001-4-4	1. <i>F. solani</i>
7	HOGA 2000-8-1	
8	HOGA 2004-20-6	
9	HOGA 2001-10-6	
10	HOGA 2004-12-MS-6	
11	HOGA 2002-53-6-MS	
12	HOGA 2006-51-16	
13	HOGA 98-6-1	2. Raza 5
14	HOGA 2006- 48-15	
15	HOGA 2002-13-1	
16	HOGA 98-73	
17	HOGA 22-MS	
18	HOGA 23-MS-7	
19	P-2245	
20	WR-315	

Cuadro11. Diseño de tratamientos en los genotipos.

Factor A	Factor B	Combinación	
a₁HOGA 021	b ₁ <i>F. solani</i>	1	a ₁ b ₁
a₁HOGA 021	b ₂ Raza 5	2	a ₁ b ₂
a₂HOGA 067	b ₁ <i>F. solani</i>	3	a ₂ b ₁
a₂HOGA 067	b ₂ Raza 5	4	a ₂ b ₂
a₃HOGA 2001-2-2	b ₁ <i>F. solani</i>	5	a ₃ b ₁
a₃HOGA 2001-2-2	b ₂ Raza 5	6	a ₃ b ₂
a₄HOGA 2002-6-3	b ₁ <i>F. solani</i>	7	a ₄ b ₁
a₄HOGA 2002-6-3	b ₂ Raza 5	8	a ₄ b ₂
a₅HOGA 2002-40-6	b ₁ <i>F. solani</i>	9	a ₅ b ₁
a₅HOGA 2002-40-6	b ₂ Raza 5	10	a ₅ b ₂
a₆HOGA 2001-4-4	b ₁ <i>F. solani</i>	11	a ₆ b ₁
a₆HOGA 2001-4-4	b ₂ Raza 5	12	a ₆ b ₂
a₇HOGA 2000-8-1	b ₁ <i>F. solani</i>	13	a ₇ b ₁
a₇HOGA 2000-8-1	b ₂ Raza 5	14	a ₇ b ₂
a₈HOGA 2004-20-6	b ₁ <i>F. solani</i>	15	a ₈ b ₁
a₈HOGA 2004-20-6	b ₂ Raza 5	16	a ₈ b ₂
a₉HOGA 2001-10-6	b ₁ <i>F. solani</i>	17	a ₉ b ₁
a₉HOGA 2001-10-6	b ₂ Raza 5	18	a ₉ b ₂
a₁₀HOGA 2004-12-MS-6	b ₁ <i>F. solani</i>	19	a ₁₀ b ₁
a₁₀HOGA 2004-12-MS-6	b ₂ Raza 5	20	a ₁₀ b ₂
a₁₁HOGA 2002-53-6-MS	b ₁ <i>F. solani</i>	21	a ₁₁ b ₁
a₁₁HOGA 2002-53-6-MS	b ₂ Raza 5	22	a ₁₁ b ₂
a₁₂HOGA 2006 51-16	b ₁ <i>F. solani</i>	23	a ₁₂ b ₁
a₁₂HOGA 2006-51-16	b ₂ Raza 5	24	a ₁₂ b ₂
a₁₃HOGA 98-6-1	b ₁ <i>F. solani</i>	25	a ₁₃ b ₁
a₁₃HOGA 98-6-1	b ₂ Raza 5	26	a ₁₃ b ₂

Continúa...

Factor A	Factor B	Combinación	
a₁₄HOGA 2006-48-15	b ₁ <i>F. solani</i>	27	a ₁₄ b ₁
a₁₄HOGA 2006-48-15	b ₂ Raza 5	28	a ₁₄ b ₂
a₁₅HOGA 2002-13-1	b ₁ <i>F. solani</i>	29	a ₁₅ b ₁
a₁₅HOGA 2002-13-1	b ₂ Raza 5	30	a ₁₅ b ₂
a₁₆HOGA 98-7-3	b ₁ <i>F. solani</i>	31	a ₁₆ b ₁
a₁₆HOGA 98-7-3	b ₂ Raza 5	32	a ₁₆ b ₂
a₁₇HOGA 22-MS	b ₁ <i>F. solani</i>	33	a ₁₇ b ₁
a₁₇HOGA 22-MS	b ₂ Raza 5	34	a ₁₇ b ₂
a₁₈HOGA 23-MS-7	b ₁ <i>F. solani</i>	35	a ₁₈ b ₁
a₁₈HOGA 23-MS-7	b ₂ Raza 5	36	a ₁₈ b ₂
a₁₉P-2245	b ₁ <i>F. solani</i>	37	a ₁₉ b ₁
a₁₉P-2245	b ₂ Raza 5	38	a ₁₉ b ₂
a₂₀WR-315	b ₁ <i>F. solani</i>	39	a ₂₀ b ₁
a₂₀WR-315	b ₂ Raza 5	40	a ₂₀ b ₂

La unidad experimental fue una maceta con cuatro plantas de garbanzo. Se utilizó el diseño completamente al azar con tres repeticiones. El modelo estadístico es el siguiente (Montgomery, 2004):

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

$$i = 1, 2, \dots, a; j = 1, 2, \dots, b; k = 1, 2, \dots, r$$

Y_{ijk} = Variable de respuesta (dato del nivel i del factor A , nivel j del factor B , en la repetición k)

μ = Media general

α_i = Efecto del nivel i del factor A

β_j = Efecto del nivel j del factor B

$(\alpha\beta)_{ij}$ = Efecto de la interacción del nivel i de A y el nivel j de B

ε_{ijk} = Error experimental, normal e independientemente distribuido, con media cero

y varianza sigma cuadrada, es decir: $[\varepsilon_{ijk} \sim NI(0, \sigma^2)]$.

Los muestreos se realizaron a partir de los 15 días después de la siembra y posteriormente se llevaron a cabo cada tercer día hasta la culminación del experimento. Las variables de respuesta registradas fueron:

1) severidad de la enfermedad. Severidad: es el grado de enfermedad que presenta la planta monitoreada.

Para medir la sintomatología ocasionada por *F. solani* y raza 5 se utilizó la siguiente escala arbitraria (Pedroza-Sandoval, 2009)

Cuadro 12. Escala arbitraria de Horsfall y Barrat, para medir la sintomatología ocasionada por *F. solani*.

Categoría	Intervalo (%)	Promedio (%)	Síntomas de la enfermedad
0	0	0	Planta sana
1	(0 < x ≤ 3]	2.34	Achaparramiento ¹
2	(3 < x ≤ 6]	4.68	Achaparramiento ²
3	(6 < x ≤ 12]	9.37	Floración temprana
4	(12 < x ≤ 25]	18.75	Flacidez
5	(25 < x ≤ 50]	37.50	Flacidez
6	(50 < x ≤ 75]	62.5	Necrosis intervenal
7	(75 < x ≤ 87]	81.25	Necrosis intervenal
8	(87 < x ≤ 94]	90.63	Necrosis del tallo
9	(94 < x ≤ 97]	95.31	Necrosis del tallo
10	(97 < x < 100)	97.66	Planta muerta
11	100	100.0	Planta muerta

¹ 5 cm de altura menos que el testigo; ² 10 cm de altura o más.

Cuadro 13. Escala arbitraria de Horsfall y Barrat, para medir la sintomatología ocasionada por raza 5 de *Foc*.

Categoría	Intervalo (%)	Promedio (%)	Síntomas de la enfermedad
0	0	0	Planta sana
1	(0 < x ≤ 3]	2.34	Achaparramiento grado 1 ¹
2	(3 < x ≤ 6]	4.68	Achaparramiento grado 2 ²
3	(6 < x ≤ 12]	9.37	Achaparramiento grado 3 ³
4	(12 < x ≤ 25]	18.75	Floración temprana
5	(25 < x ≤ 50]	37.50	Marchitez grado 1
6	(50 < x ≤ 75]	62.5	Marchitez grado 2
7	(75 < x ≤ 87]	81.25	Marchitez grado 3
8	(87 < x ≤ 94]	90.63	Marchitez grado 4
9	(94 < x ≤ 97]	95.31	Marchitez grado 5
10	(97 < x < 100)	97.66	Planta muerta
11	100	100.0	Planta muerta

¹ 5 cm de altura menos que el testigo; ² (5 ≤ 10 cm ídem); ³ > 10 cm ídem.

Para medir la proporción de plantas vivas y muertas de cada genotipo se utilizó la siguiente escala Navas-Cortés *et al.*, (2007). (Cuadro 14).

Cuadro 14. Escala de medición del porcentaje de plantas vivas y muertas.

No.	Rango de severidad	Síntoma
1	1-33%	Resistente
2	34-66%	Intermedia
3	67-100%	Susceptible

7.9. Análisis estadístico

Las reacciones de la enfermedad de las plantas fueron evaluadas observándose la severidad de los síntomas de cada planta en las unidades experimentales a intervalos de 2 días usando las escalas antes mencionadas.

Se realizó un análisis de varianza que permitió identificar posibles efectos entre los factores de variación evaluados, genotipos y patógenos, y la prueba de rango múltiple de medias de TUKEY usando como variable de respuesta la severidad de la enfermedad. Debido a que los datos de severidad se ajustan a la distribución binomial, se transformaron al arcoseno para aproximarlos a la distribución normal y estos se procesaron empleando el paquete estadístico SAS (versión 9.2).

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Colecta de plantas, aislamiento, identificación morfológica de *Fusarium* spp. y extracción de ADN.

Se colectaron un total de 100 plantas con síntomas de marchitez. Se obtuvieron un total de 70 monospóricos los cuales correspondieron a *Fusarium* spp. a los mismos que se les extrajo el ADN.



Figura 3. Cepa obtenida por cultivo monospórico de *Fusarium* spp.

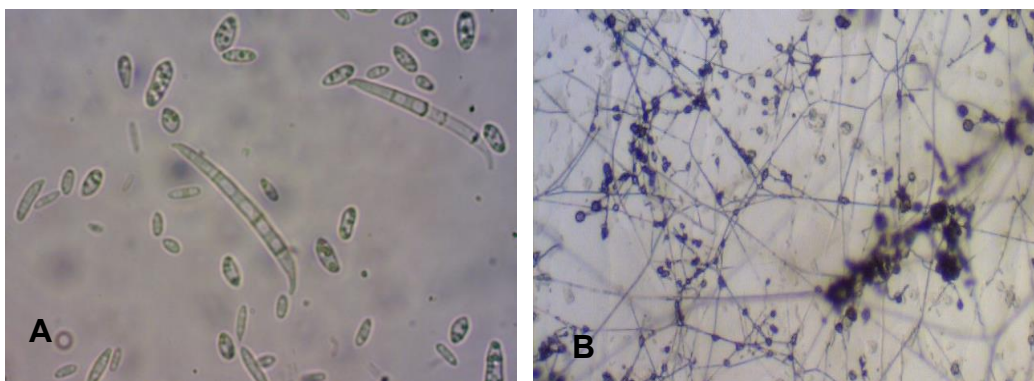


Figura 4. *F. oxysporum*: A) Macro y Microconidias B) Microconidias *in situ* en medio CLA.

8.2. Identificación molecular mediante PCR de *Fusarium* spp. y análisis electroforético de los amplificados.

Se analizaron un total de 70 ADN's extraídos de cada cepa, a cada uno se le realizaron pruebas de PCR para la identificación de la especie *F. oxysporum*.

8.2.1. Detección de *Fusarium oxysporum* mediante PCR.

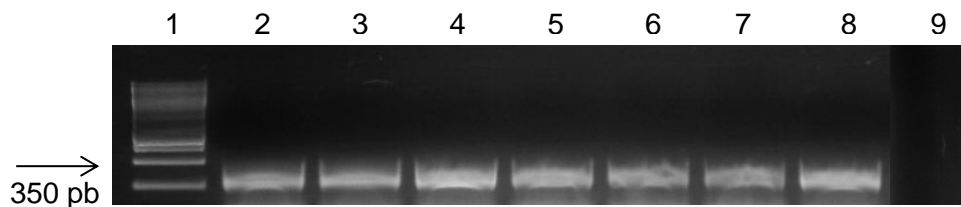


Figura 5. Detección de *Fusarium oxysporum* aislado en plantas de garbanzo. Carril 1, marcador de tamaño molecular 1 Kb Ladder; carriles 2-7 se observa la separación electroforética de los amplicones de PCR obtenidos con el uso de iniciadores específicos para *Fo*, carril 8, se observa el amplicón usado como control positivo, carril 9, control negativo (sin ADN). En los carriles 2 y 7 se observa el fragmento de 350 pb correspondiente al amplicón predicho para a *Fo*, con el uso de iniciadores reportados por Mishra *et al.*, (2003).

8.2.2. Detección de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* mediante PCR.

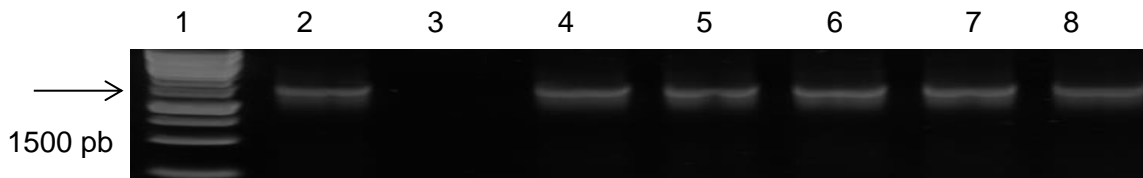


Figura 6. Detección de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* aislado en plantas de garbanzo. Carril 1, marcador de tamaño molecular 1 Kb Ladder; carril 2, se observa el control positivo, carril 3, control negativo (sin ADN), carriles 4-8 se observa la separación electroforética de los amplicones de PCR obtenidos con el uso de iniciadores específicos para *Foc*. En los carriles 4 y 8 se observa el fragmento de 1500 pb correspondiente al amplicón predicho para a *Foc*, con el uso de iniciadores reportados por Jiménez-Gasco y Jiménez-Díaz (2003).

8.2.3. Detección de raza 5 de *Foc* mediante PCR.

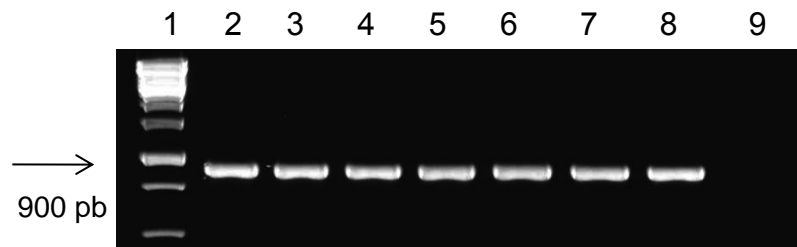


Figura 7. Detección de la raza 5 aislada en plantas de garbanzo. Carril 1, marcador de tamaño molecular Hypper Ladder IV; carriles 2-7 se observa la separación electroforética de los amplicones de PCR obtenidos con el uso de iniciadores específicos para la raza 5, carril 8 se observa el control positivo, carril 9, control negativo (sin ADN). En los carriles 2 y 7 se observa el fragmento de 900 pb correspondiente al amplicón predicho para la raza 5, con el uso de iniciadores reportados por Jiménez-Gasco y Jiménez-Díaz (2003).

8.3. Análisis de multiresistencia genética

En las unidades experimentales presentadas como testigo, es decir sin inóculo, no se presentaron signos de la enfermedad (Figura 8).



Figura 8. Genotipos testigos (sin inóculo).

Con respecto al ensayo de resistencia y susceptibilidad en las (Figuras 9 a la 26) se observan los genotipos evaluados con inoculaciones de *F. solani*, comparados con los testigos resistente y susceptible.

En cuanto al ensayo de resistencia y susceptibilidad en las (Figuras 27 a la 44) se observan los genotipos evaluados con inoculaciones de raza 5 de *Foc*, comparados con los testigos resistente y susceptible.

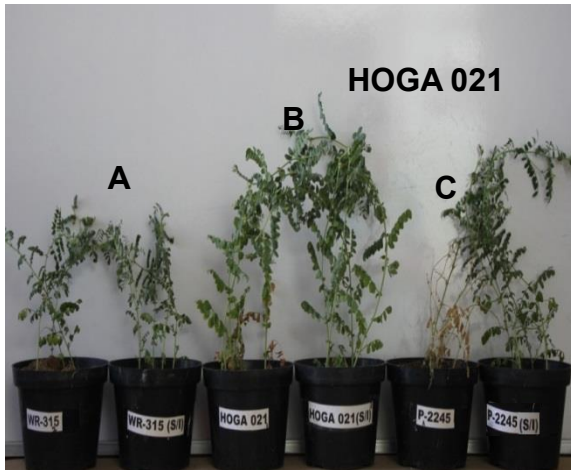


Figura 9. Genotipo HOGA 021 (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C).

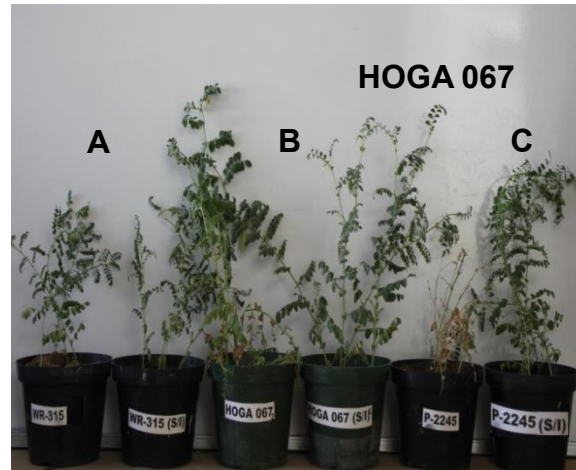


Figura 10. Genotipo HOGA 067 (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C).

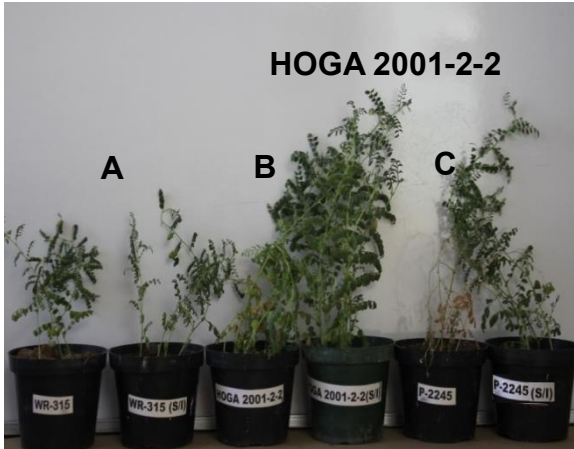


Figura 11. Genotipo HOGA 2001-2-2 (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C).

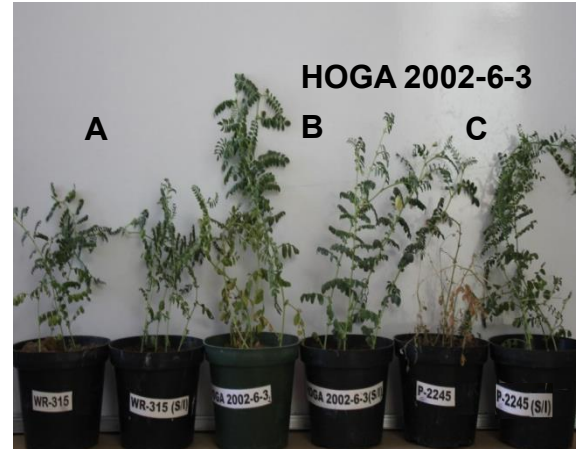


Figura 12. Genotipo HOGA 2002-6-3 (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C).

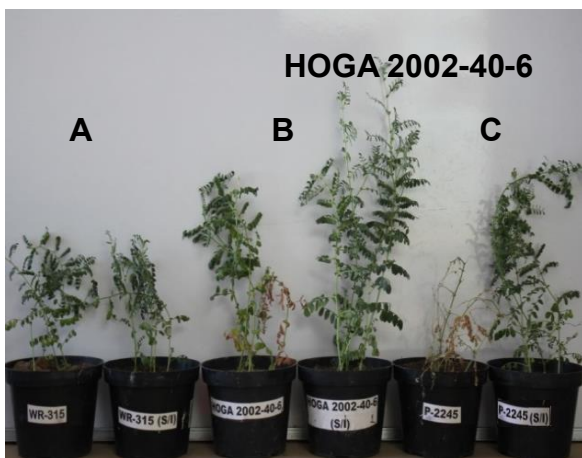


Figura 13. Genotipo HOGA 2002-40-6 (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C).

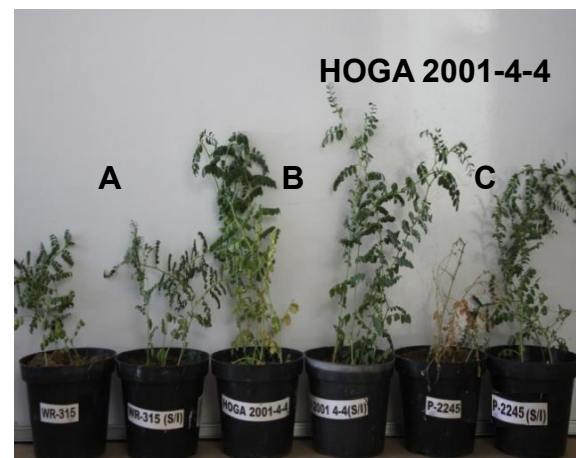


Figura 14. Genotipo HOGA 2001-4-4 (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C).

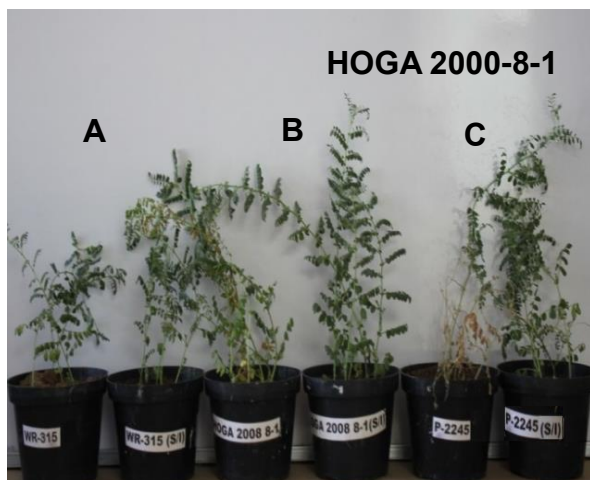


Figura 15. Genotipo HOGA 2000-8-1 (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C).

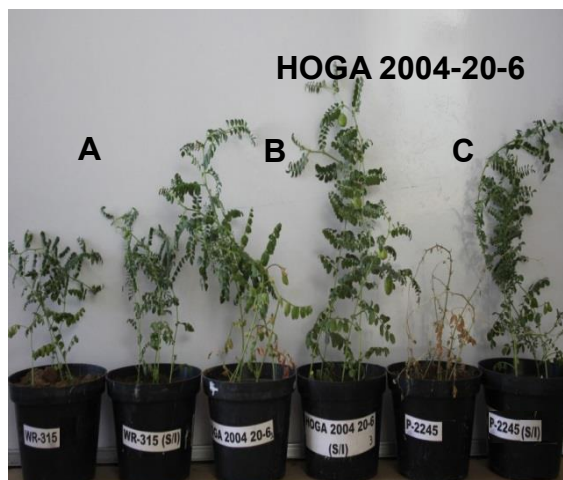


Figura 16. Genotipo HOGA 2004-20-6 (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C).

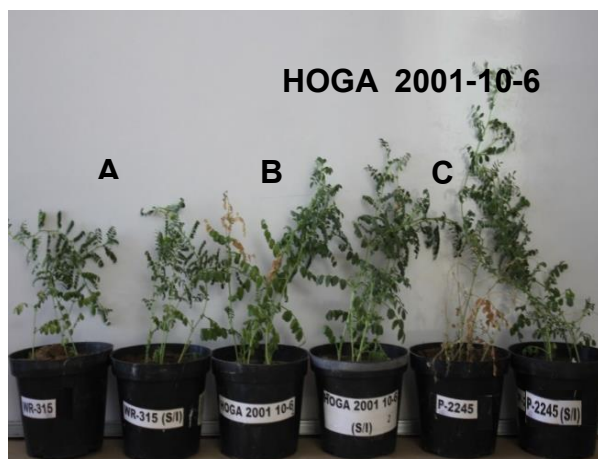


Figura 17. Genotipo HOGA 2001-10-6 (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C).

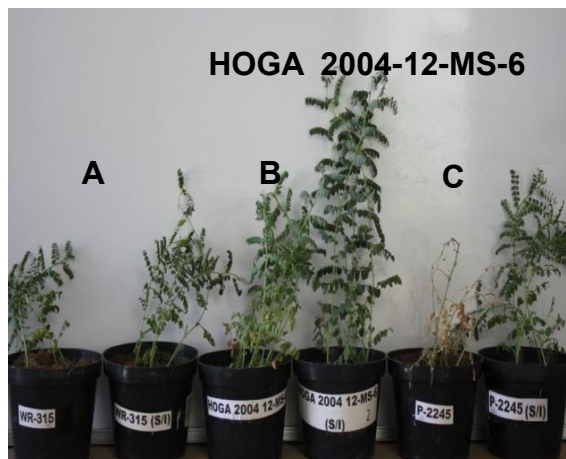


Figura 18. Genotipo HOGA 2004-12-MS-6 (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C).

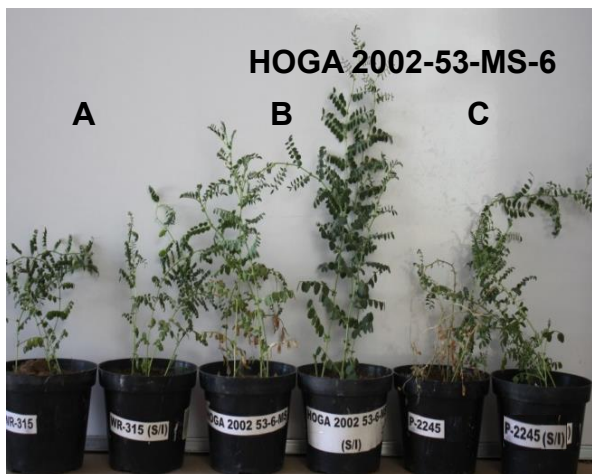


Figura 19. Genotipo HOGA 2002-53-MS-6 (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C).

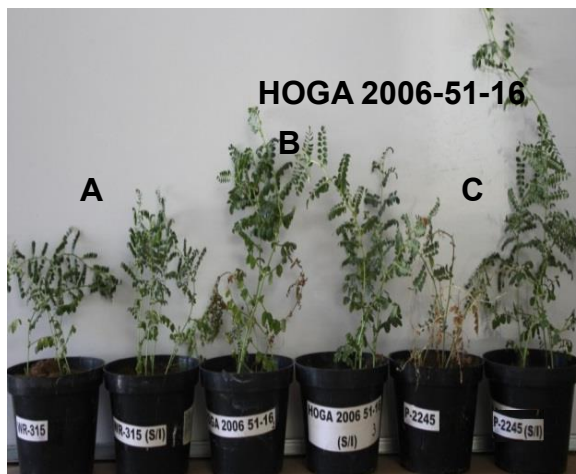


Figura 20. Genotipo HOGA 2006-51-16 (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C).

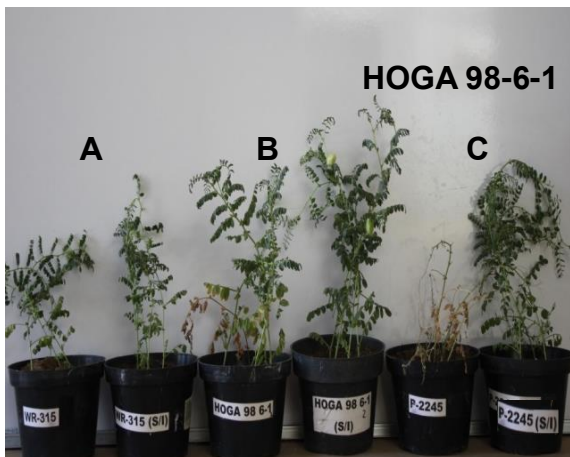


Figura 21. Genotipo HOGA 98-6-1 (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C).

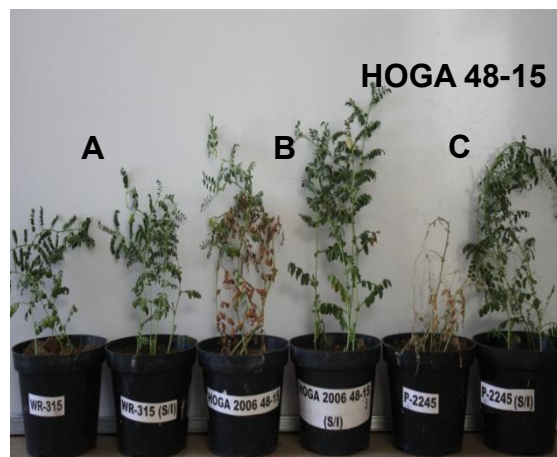


Figura 22. Genotipo HOGA 48-15 (B) comparado con los testigos resistente (A) v susceptible (C).

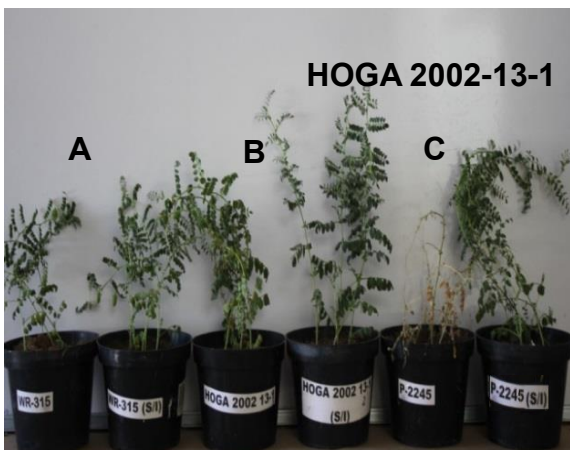


Figura 23. Genotipo HOGA 2002-13-1 (B) comparado con los testigos resistente (A) v susceptible (C).

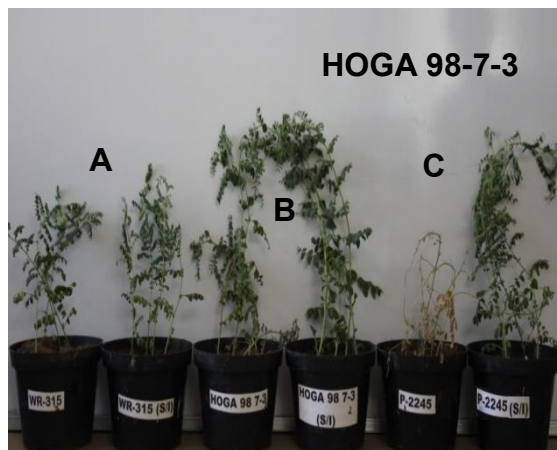


Figura 24. Genotipo HOGA 98-7-3 (B) comparado con los testigos resistente (A) v susceptible (C).

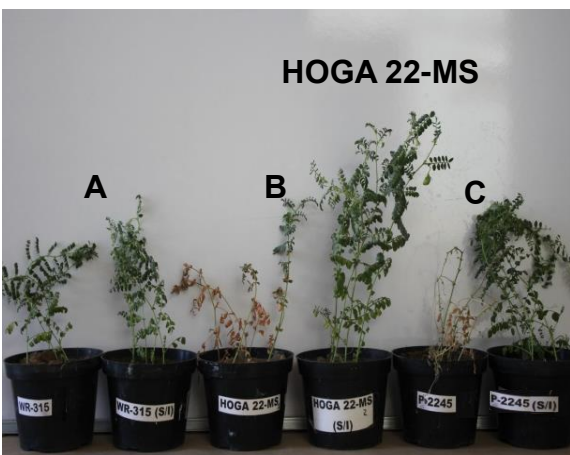


Figura 25. Genotipo HOGA 22-MS (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C).

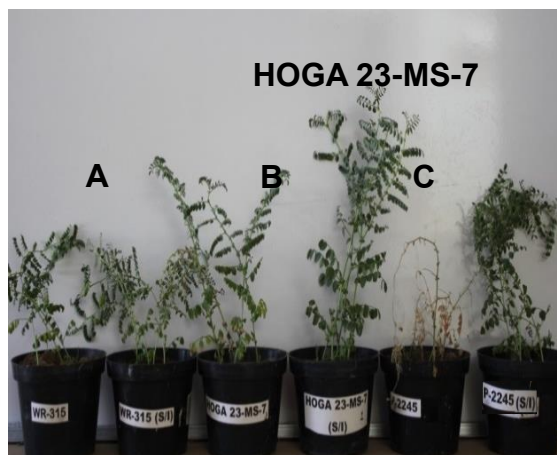


Figura 26. Genotipo HOGA 23-MS-7 (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C).

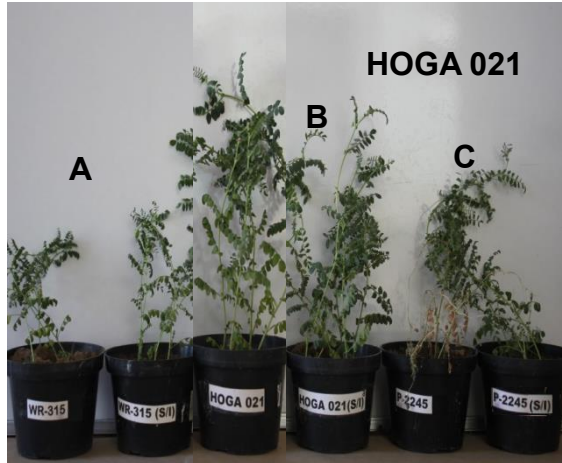


Figura 27. Genotipo HOGA 021 (B) comparado con los testigos resistente (A) v susceptible (C).

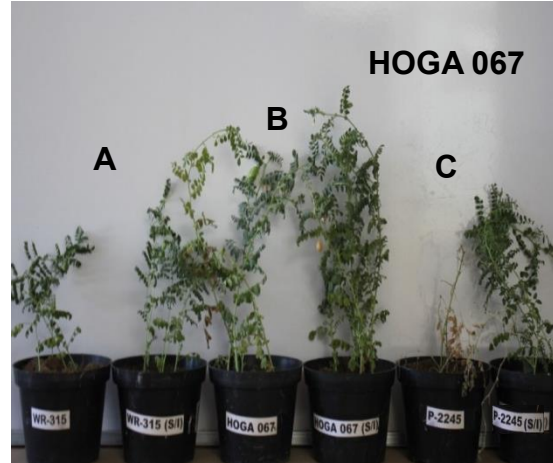


Figura 28. Genotipo HOGA 067 (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C).

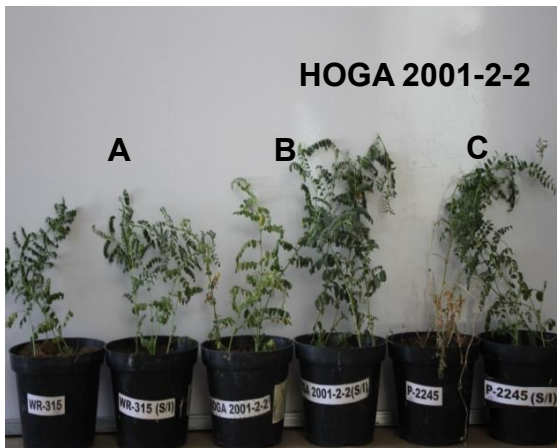


Figura 29. Genotipo HOGA 2001-2-2 (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C).

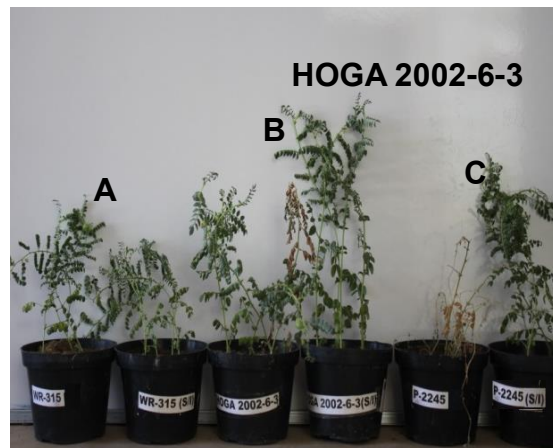


Figura 30. Genotipo HOGA 2002-6-3 (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C).

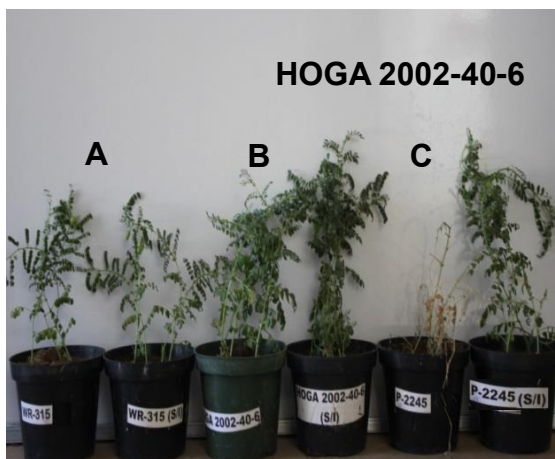


Figura 31. Genotipo HOGA 2002-40-6 (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C).

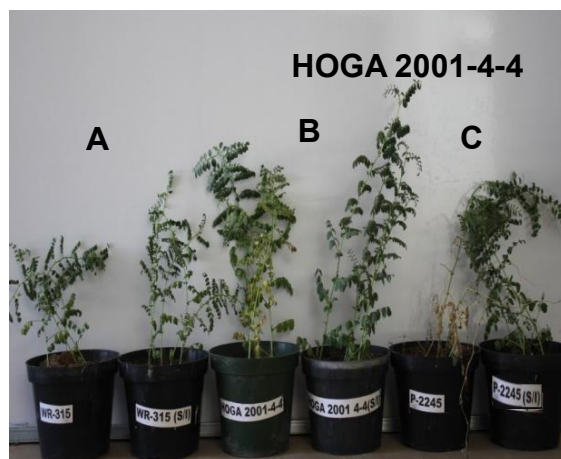


Figura 32. Genotipo HOGA 2001-4-4 (B) comparado con los testigos resistente (A) v susceptible (C).

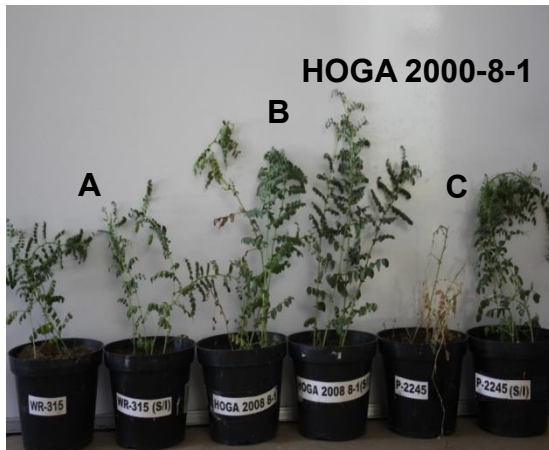


Figura 33. Genotipo HOGA 2000-8-1 (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C).

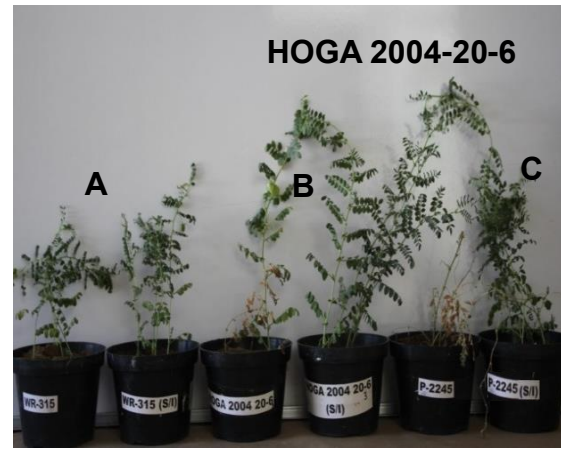


Figura 34. Genotipo HOGA 2004-20-6 (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C).

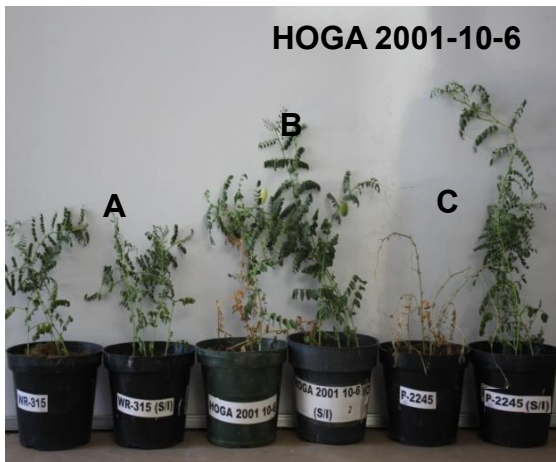


Figura 35. Genotipo HOGA 2001-10-6 (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C).

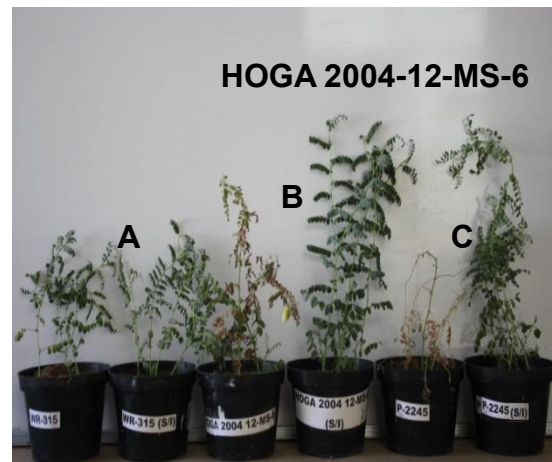


Figura 36. Genotipo HOGA 2004-12-MS-6 (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C).

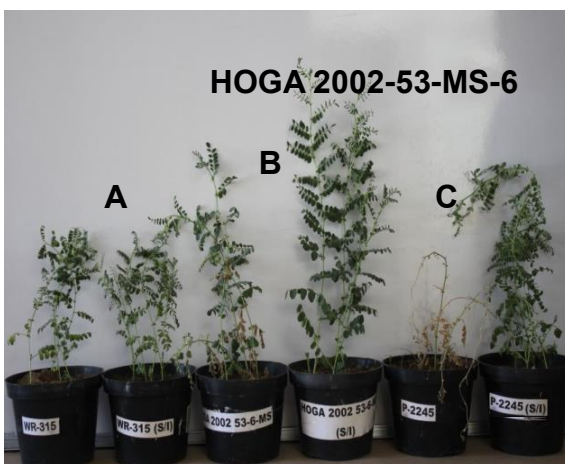


Figura 37. Genotipo HOGA 2002-53-MS-6 (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C).

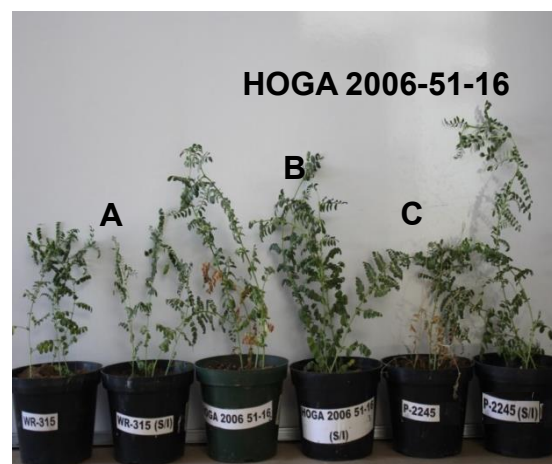


Figura 38. Genotipo HOGA 2006-51-16 (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C).

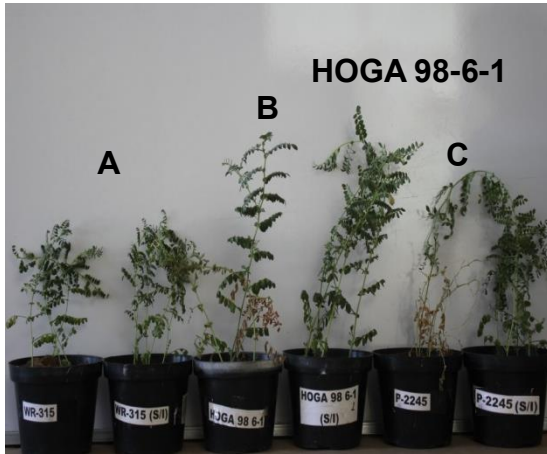


Figura 39. Genotipo HOGA 98-6-1 (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C).

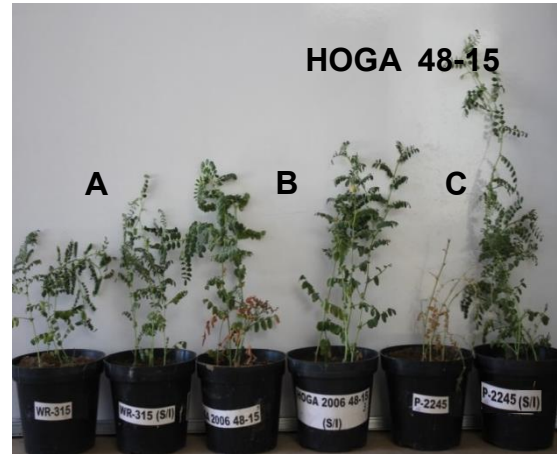


Figura 40. Genotipo HOGA 48-15 (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C).

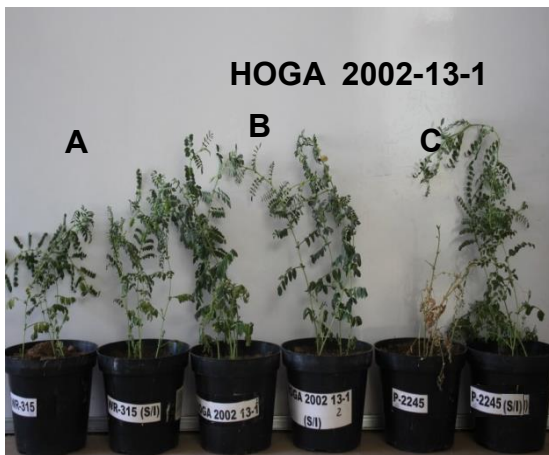


Figura 41. Genotipo HOGA 2002-13-1 (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C).

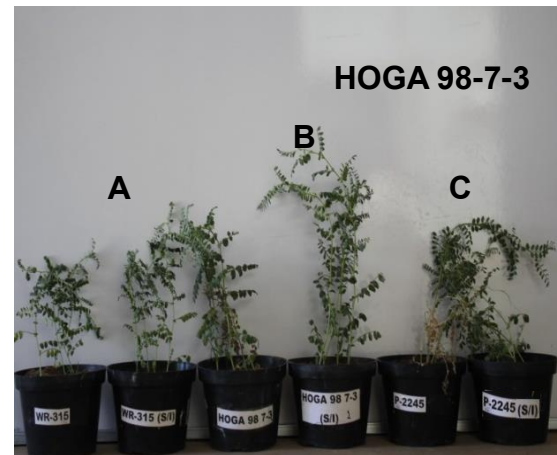


Figura 42. Genotipo HOGA 98-7-3 (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C).

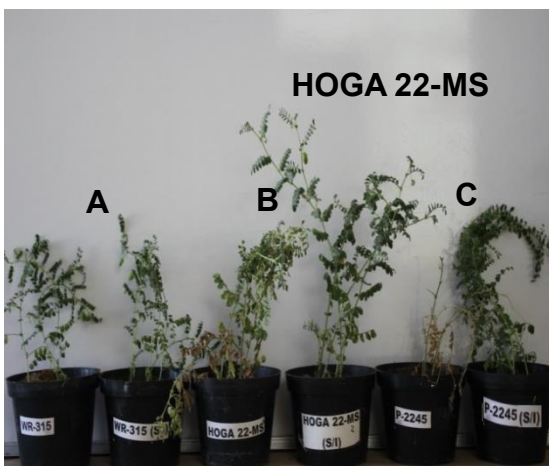


Figura 43. Genotipo HOGA 22-MS (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C).

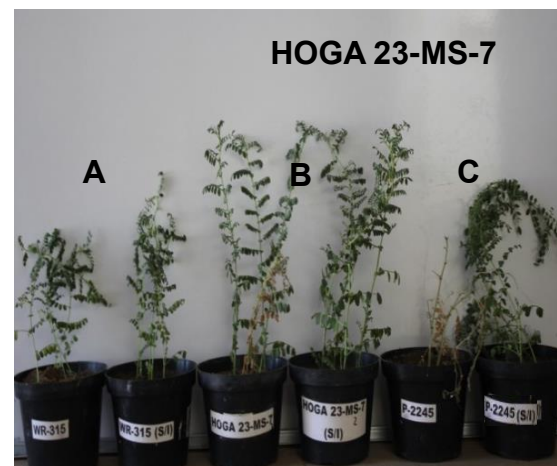


Figura 44. Genotipo HOGA 23-MS-7 (B) comparado con los testigos resistente (A) y susceptible (C).

Cuadro 15. Comparación de la severidad media¹ ocasionada por *F. solani* y raza 5 de *Foc*. A los 43 días después de la siembra.

Genotipo	T. S/I		<i>F. solani</i>			Raza 5 de <i>Foc</i>	
	% enf	Arc	% enf	Arc		% enf	Arc
HOGA 021	0.00	b	20.84	a		0.00	b
HOGA 067	0.00	b	20.45	a	c	10.42	b
HOGA 2001 2-2	0.00	b	12.50	ab		26.69	b
HOGA 2002-6-3	0.00	b	24.48	a	cd	16.28	b
HOGA 2002-40-6	0.00	b	20.64	a	c	0.00	b
HOGA 2001 4-4	0.00	b	22.92	a	c	13.54	b
HOA 2000 8-1	0.00	b	22.92	a	c	19.79	b
HOGA 2004 20-6	0.00	b	15.94	a		35.94	b
HOGA 2001-10-6	0.00	b	11.46	a	cd	57.55	ab
HOGA 2004-12-MS-6	0.00	b	17.71	a	cd	45.57	b
HOGA 2002-53-MS-6	0.00	b	25.26	a	c	15.11	b
HOGA 2006-51-16	0.00	b	45.05	a	bc	32.94	b
HOGA 98-6-1	0.00	b	20.64	a	c	32.55	b
HOGA 48-15	0.00	b	20.64	a	c	36.46	b
HOGA 2002-13-1	0.00	b	14.59	a	cd	10.68	b
HOGA 98-7-3	0.00	b	16.67	ab		31.97	b
HOGA 22-MS	0.00	c	74.61	a		37.57	b
HOGA 23-MS-7	0.00	b	17.32	a	cd	24.80	b
P-2245	0.00	b	100	a		100	a
WR-315	0.00	a	0.00	a	d	0.00	b

¹Tukey= 25.25 (comparación de medias de cada columna, Genotipos).

¹Tukey=20.95 (comparación de medias de casa hilera, Patógenos y testigo).

Las medias con la misma letra significan que son estadísticamente iguales.

² Comparaciones horizontales. Letras arriba de las medias comparan patógenos y testigo.

³ Comparaciones verticales. Letras después de las medias comparan genotipos.

Comparando el grado de severidad en genotipos inoculados con *F. solani* y raza 5 de *Foc*, el testigo usado como resistente (WR-315) y el testigo usado como susceptible (P-2245) se comportaron igual con ambos patógenos. En los genotipos HOGA 021 y HOGA 2002-40-6 presentaron daño con *F. solani*, mientras que con raza 5 de *Foc* no tuvieron daño. *F. solani* obtuvo un grado de virulencia más alto en los genotipos HOGA 067, HOGA 2002-6-3, HOGA 2001-4-4, HOGA 2000-8-1, HOGA 2002-53-MS-6, HOGA 2006-51-16 y HOGA 2002-13-1 comparado con raza 5 de *Foc*, aun así no tan diferente, como en el caso del genotipo HOGA 22-MS donde es notable el grado de severidad de *F. solani* con respecto a raza de *Foc*. En los genotipos HOGA 2001-2-2, HOGA 2004-20-6, HOGA 98-6-1, HOGA 48-15, HOGA 98-7-3 y HOGA 23-MS-7 se comportó con un grado de virulencia más alto raza 5 de *Foc* que *F. solani*. Un cambio notable se presentó los genotipos HOGA 2001-10-6 y HOGA 2004-12-MS-6 donde el grado de virulencia se mostró significativamente mayor en raza 5 de *Foc* en comparación de *F. solani*.

Cuadro 16. Resultados por genotipo de garbanzo, en *F. solani* y raza 5 de *Foc.* En base a la escala de severidad de los daños propuesta por Navas-Cortés (2007).

	Genotipos	Porcentaje (%)	
		<i>F. solani</i>	Raza 5 de <i>Foc.</i>
1	HOGA 021	R(8.25)7	R(0)
2	HOGA 067	R(0)	R(0)
3	HOGA 2001-2-2	R(0)	R(8.25)
4	HOGA 2002-6-3	R(0)	R(16.5)
5	HOGA 2002-40-6	R(8.25)	R(0)
6	HOGA 2001-4-4	R(0)	R(0)
7	HOGA 2000-8-1	R(0)	R(0)
8	HOGA 2004-20-6	R(0)	R(24.75)
9	HOGA 2001-10-6	R(0)	I(41.25)
10	HOGA 2004-12-MS-6	R(8.25)	R(24.75)
11	HOGA 2002-53-MS-6	R(0)	R(0)
12	HOGA 2006-51-16	R(8.25)	R24.75)
13	HOGA 98-6-1	R(8.25)	R(33)
14	HOGA 48-15	R(24.75)	R(16.5)
15	HOGA 2002-13-1	R(0)	R(0)
16	HOGA 98-7-3	R(16.5)	R(8.25)
17	HOGA 22-MS	S(74.25)	R(24.75)
18	HOGA 23-MS-7	R(0)	R(24.75)
19	P-2245	S(100)	S(100)
20	WR-315	R(0)	R(0)

En cuanto al ensayo de resistencia y susceptibilidad los genotipos HOGA 021, HOGA 067, HOGA 2001-2-2, HOGA 2002-6-3, HOGA 2002-40-6, HOGA 2001-4-4, HOGA 2000-8-1, HOGA 2004 20-6, HOGA 2004-12-MS-6, HOGA 2002-53-MS-6, HOGA 2006 51-16, HOGA 98-6-1, HOGA 48-15, HOGA 2002-13-1, HOGA 98-7-3 y HOGA 23-MS-7, fueron resistentes a *F. solani* y a la raza 5 de *Foc*; el genotipo HOGA 22-MS fue susceptible a *F. solani* y el genotipo HOGA 2001-10-6 se comportó como intermedia con raza 5.

IX. CONCLUSIONES

De los 18 genotipos evaluados, el 94.4 % fueron resistentes a *F. solani* y a la raza 5 de *Foc*.

X. LITERATURA CITADA

- Abdullah, A.A.H. 2010. Pathogenicity of fungi associated with leguminous seeds in the Eastern kingdom of Saudi Arabia. *African Journal of Agricultural Research* 5 (10), 1117-1126.
- Ali, H., Alam, S.S., Attanayake R.N., Rahman M. y Chen W. 2012. Population Structure and Mating Type Distribution of the Chickpea Blight Pathogen *Ascochyta rabiei* from Pakistan and the United States. *Journal of Plant Pathology* 94 (1), 99-108.
- Allen, D.J. 1983. *The Pathology of Tropical Food Legumes*. John Wiley and Sons, New York, 413 pp.
- APS (Sociedad Americana de Fitopatología). Por sus siglas en ingles. 2004. Disponible en internet:
<http://www.the-aps.org/>
- Asmaa, A., Ibrahim I.K.A., Shehata M.R.A. y El-Saedy M.A.M. 2007. Interaction between Certain Root-Rot Fungi and the Root-Knot Nematode, *Meloidogyne incognita* on Sunflower Plants. *Egypt J Phytopathology* 35 (1) 1-11.
- Ávila, J. T., De Vera A. M., Hernández C. y Vasallo P. M. 1995. Análisis del DNA. II: Clonar, secuenciar y PCR. *Nefrología*. Tenerife. 15 (2).
- Ayyar, V.R. e Iyer R.B. 1936. A preliminary note on the mode of inheritance of reaction to wilt in *Cicer arietinum* L. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences* 3:438-443.
- Bayraktar, H. y Dolar F.S, 2009. Genetic diversity of wilt and root rot pathogens of chickpea, as assessed by RAPD and ISSR markers. *Turk J Agric For* 33: 1-10.

- Bhatti, M.A. y Kraft J.M. 1992. Reaction of selected chickpea lines to *Fusarium* and *Thielaviopsis* root rots. *Plant Dis* 76:54-56.
- Brody, J.R. y Scott E.K. 2004. Sodium boric acid: A tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. *Biotechniques* 36 (2):2-4.
- Buddenhagen, I.W. y Workneh F.1988. Fusarium wilt of chickpea in California. *Phytopathology* 78:1563.
- Burgess, L. W. and Summerell B.A. 1992. Mycogeography of Fusarium: Survey of Fusarium species from subtropical and semi-arid grassland soils from Queensland, Australia. *Mycological Research* 96: 780-784. (chlamydosporum, compactum, longipes, napiforme, nygamai, scirpi, solani)
- Bushra, R., Kavita P., Mohd A.G., Mansoor A. S. 2012. Management of Root Knot Nematode, *Meloidogyne incognita* Affecting Chickpea, *Cicer arietinum* for Sustainable Production. *Biosciences International* 1(1):1-5.
- Cabrera-de la Colina, J., Trapero-Casas A. y Jiménez-Díaz R.M. 1985. Races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* Andalucía. *International Chickpea Newsletter* 13:24-26.
- Cárdenas, T., Regla M. y De la Fe M.C.F. 2013. Respuesta de genotipos de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) a la roya (*Uromyces ciceris-arietini* (Grognot) Jacz. & Boyd y su relación con el tipo de hoja. *Cultivos Tropicales* 34 (4):50-54.
- Cho, S.W., Mitchel I A., Regier J.C., Mitter, C., Poole R.W., Friedlander T.P. y Zhao S.W. 1995. A highly conserved nuclear gene for low-level phylogenetics-Elongation-Factor-1-Alpha recovers morphology-based tree for Heliothine moths. *Molecular Biology y Evolution* 12:650-656.

- Conddington, A. y Gould D.S. 1992. Use of RFLPs to identify of fungal pathogens.
En: Techniques for the rapid detection of Plant Pathogens: Duncan JM y
Torrance L. (eds). Brithish Society for Plant Pathology. Blackwell Science
Publications, Oxford, UK, pp 162-176.
- Cortez-Mondaca, E. y Pérez-Márquez J. Manejo de Insectos Plaga en Garbanzo.
En: Memoria Simposio Nacional de Garbanzo 2013. México. INIFAP, pp
126-134.
- De Miguel, G.E. 1991. El garbanzo una alternativa para el secano. Ediciones
Mundi-Prensa. Madrid, España.
- Di Pietro A., García-Maceira F.I., Meglecz E. y Roncero M.I. 2001. A MAP kinase
of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root
penetration and pathogenesis. Mol. Microbiol 39:1140-1142.
- Dubey, S. C., Suresh M. and Singh B. 2007. Evaluation of Trichoderma species
against *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceris for integrated management of
chickpeawilt. Biol Control 40:118–127. doi:10.1016/j.biocontrol.2006.06.006.
- Dueñas-García, J.M., Shagarodsky T., Fresmeda J.A., Hernández-Fundora y
González J. 2007. Caracterización de especies del género *Fusarium* en el
cultivo del Garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en las provincias Ciudad Habana
y La Habana. Temas de Ciencia y Tecnología 11(32), pp 63-66.
- Duke, J.A. 1981. Handbook of legumes of world economic importance. Plenum
Press, NY.
- Echandi, E. 1970. Wilt of chickpeas or garbanzo beans (*Cicer arietinum* L.) Incited
by *Fusarium oxysporum*. Phytopathology 60:1539.

- Erwin, D.C. y Snyder W.C. 1958: Yellowing of garbanzo Beans. *Calif Ag* 11: 6-16.
- FAOSTAT (División de Estadística de la Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura).2013. Disponible en internet:
<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>
- Fierro-Corrales, D., Cárdenas-Soriano E., Quintero-Benítez J.A., Apodaca-Sánchez M.A., Valdovinos-Ponce G., Tovar-Pedraza J.M, Saucedo-Acosta C.P. Histopathology of chickpea leaves infected by *Peronospora ciceris* Agarwal. Congreso Internacional/XXXVIII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología.
- Fierros-Leyva, G.A., Ortega- Murrieta P.F., Valenzuela-Herrera V., Acosta-Gallegos J.A., Padilla-Valenzuela I., Gutiérrez Pérez E., Velarde-Félix S. y Rodríguez-Cota F.G. 2013. Mejoramiento genético: Una alternativa para el combate de enfermedades en garbanzo. En: Simposio Nacional de Garbanzo 2013. México. INIFAP, pp 42-53.
- Frisullo, S., Ciccarese F., Amenduni M. y Zamani H.R. 1989. Wilt of chickpea (*Cicer arietinum* L.) by *Fusarium oxysporum* f. sp. *Ciceris* Schlech in Southern Italy. *Difesa delle Piante* 12:181-182.
- Gan, Y.T., Siddique K.H.M., MacLeod W.J. y Jayakumar P. 2006. Management options for minimizing the damage by ascochyta blight (*Ascochyta rabiei*) in chickpea (*Cicer arietinum* L.) *Field Crops Research* 97 121–134.
- García, Q. R. 1977. Efecto de 4 densidades y 3 fechas de siembra en el rendimiento de 3 variedades de garbanzo blanco en la Costa de Hermosillo. *Avances de investigación CIANO No.1*. P.56.

- García-Estrada, R., Carrillo-Fasio J.A. y Márquez-Zequera I. 2004. Distribución e identificación de los patógenos relacionados con la rabia del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en el estado de Sinaloa, México. Memoria Foro Regional de Garbanzo (Fundación Produce Sinaloa). Guamúchil, Sinaloa, México, pp 87.
- Gayatri, G., Maneesha B., Ashok G. y Vidya G. 2009. Identification of Indian pathogenic races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* with gene specific, ITS and random markers. *Mycologia* 101(4), 484–495.
- Geiser, D., Jiménez-Gasco M., Kang S., Makalowska I., Veeraraghavan N., Ward T.J., Zhang N., Kuldau G.A. y O'Donnell K. 2004. FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology* 110:473–479.
- Ghanekar, A.M., Sethi S.C., Jalali B.L. y Nene Y. L. 1990. ICCV6 (ICCC32) a kabuli chickpea resistant to *Fusarium* wilt and root rots. *International Chickpea Newsletter* 23:22-23.
- Gupta, S.D., Chakraborti R.K., Rangi D.B. y Das S. 2009. A molecular insight into the early events of chickpea (*Cicer arietinum*) and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (Race 1) interaction through cDNA-AFLP analysis. *Phytopathology* 99:1245-1257.
- Halila, H.M. y Strange R.N. 1996. Identification of the causal agent of wilt of chickpea in Tunisia as *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* race 0. *Phytopathol Mediterr* 35:67-74.

- Hameeda, B.G., Harini O.P., Rupela J.V.D., Kumar R.K. y Gopal R. 2010. Biological Control of Chickpea Collar Rot by Co-inoculation of Antagonistic Bacteria y Compatible Rizhobia. *Indian J Microbiol* 50 (4):419-424.
- Haware, M.P. y Nene Y.L. 1982a. Symptom less carriers of the chickpea wilt *Fusarium*. *Plant Dis* 66:250-251.
- Haware, M.P. y Nene Y.L. 1982b. Races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Plant Dis* 66:809-810.
- Haware, M.P., Nene Y.L. y Natajaran M. 1996. Survival of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* in the soil in the absence of chickpea. *Pythopathol Mediterr* 35:9-12.
- Haware, M.P., Nene Y.L. y Rajeshwari R. 1978. Erradication of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* transmitted in chickpea seed. *Phytopathology* 68:1364-1367.
- Haware, M.P., Nene Y.L. y Mathur S.B. 1986. Seed-borne diseases of chickpea. En: *Technical Bulletin (Danish Government Institute of Seed Technology for Developing Countries, eds)*. 1, pp 32.
- Heid, C. A., Stevens J., Livak K. J. and Williams P. M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Research*.6: 986-994.
- Hervas, A., Landa B., Datnoff L. E. and Jiménez-Díaz R. M. 1998. Effects of commercial and indigenous microorganisms on *Fusarium* wilt development in chickpea. *Biological Control* 13:166–176.
- Hoagland, D.R. y Arnon D.I. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station.Circular* 347: pp 1-32.

- Horsfall, J. G. y Barratt R. W. 1945. "An Improved Grading System for Measuring Plant Disease", *Phytopathology* 35:655.
- Hwang, S.F., Gossen B.D., Chang K.F., Turnbull G.D., Howard R.J. y Blade S.F. 2003. Etiology, impact and control of rhizoctonia seedling blight and root rot of chickpea on the Canadian Prairies. *Can J Plant Sci*83: 959-967.
- INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias). 2013. Disponible en internet:
<http://www.inifap-noroeste.gob.mx/>
- Jalali, B.L. y Chand H. 1992. Chickpea wilt. En: *Plant diseases international importance. Diseases of cereals and pulses.* Singh US, Mukhopadhyay AN, Kumar J y Chaube HS. (eds). Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ, 1, pp 420-444.
- Jiménez-Díaz, R.M. 1994. La fusariosis Vasculare del garbanzo causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*: 15 años de Investigación en España. *Investigación Agraria: Producción y Protección Vegetales* 2: 285-294.
- Jiménez-Díaz, R.M. y Traperó-Casas A. 1990. Improvement of chickpea resistance to wilt and root rot disease. *CIHEAM Option Mediterraneennes. Série Séminaires* 9:65-72.
- Jiménez-Díaz, R.M., Alcalá-Jiménez A.R., Hervas A. y Traperó-Casas J.L. 1993. Pathogenic variability and host resistance in the *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris/Cicer arietinum* pathosystem. En: *Proc. 3rd Eur. Semin. Fusarium mycotoxins, taxonomy, pathogenicity and host resistance.* Hodowska Roslin Aklimatyazacja i Nasiennictwo. Plant Breeding and Acclimatization Institute, Radzików, Poland. pp 87-94.

- Jiménez-Díaz, R.M., Basallote-Ureba M.J. y Rapoport H. 1989a. Colonization and pathogenesis in chickpea infected by races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. Vascular Wilt Diseases of Plants. NATO ASI. Tjamos EC y Beckman CH. (eds). Springer-Verlag, Berlin. Ser. 28: pp 113-121.
- Jiménez-Díaz, R.M., Crino P., Halila M.H., Mosconi C., Trapero-Casas, A.T. 1993. Screening for resistance to *Fusarium* wilt and *Ascochyta* blight in chickpea. En: Singh KB, Saxena MC. (eds). Breeding for Stress Tolerance in Cool-Season Food Legumes, John Wiley & Sons, Chichester, UK, pp. 77-95.
- Jiménez-Díaz, R.M., Trapero-Casas A. y Cabrera de la C.J. 1989b. Races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* infecting chickpea in southern Spain. En: Vascular Wilt Diseases of Plants. Tjamos EC y Beckman CH. (eds). NATO ASI Series. H28, Springer Verlag, Berlin. pp 515-520.
- Jiménez-Gasco, M.M. y Jiménez-Díaz R.M. 2003. Development of a specific PCR-based assay for the identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and its pathogenic races 0, 1B/C, 5 and 6. Phytopathology 107:200-209.
- Jiménez-Gasco, M.M., Pérez-Artes E. y Jiménez-Díaz R.M. 2001. Identification of pathogenic races 0, 1B/C, 5 and 6 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* with random amplified polymorphic DNA (RAPD). European Journal of Plant Pathology 107: 237-248.
- Kaiser, W.J. 1981. Source Diseases of Chickpea, Lentil, Pigeon Pea, and Tepary Bean in Continental United States and Puerto Rico. Economic Botany 35(3), 300-320.

- Kannaiyan, J., Nene L., Reddy M.V., Ryan J.G. and Raju, T.N. 1984. Prevalence of pigeonpea (*Cajanus cajan*) diseases and associated crop losses in Asia, Africa and the Americas. *Tropical Pest Management* 30: 62-71. (udum)
- Kelly, A.G., Alcalá-Jiménez A.R., Bainbridge B.W., Heale J.B., Pérez-Artés E. y Jiménez-Díaz, R.M. 1994. Use of genetic fingerprinting and Random Amplified Polymorphic DNA to characterize pathotypes of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* infecting chickpea. *Phytopathology* 84:1293-1298.
- Kistler, H.C. 1997. Genetic diversity in the plant-pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 87:474-79.
- Komada, H. 1975. Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil. *Rev Plant Prot Res* 8: 114.
- Kraft, J.M., Haware M.P., Jiménez-Díaz R.M., Bayaa B. y Harrab M. 1994. Screening techniques and sources of resistance to root rots and wilts in cool season food legumes. En: Muehlbauer FJ y Kaiser WJ. (eds). *Expanding the production and use of cool season food legumes*. Dordrecht, Kluwer Academic Publ. Netherlands, pp 268-289.
- Kumar, J. y Haware M.P. 1982. Inheritance to *Fusarium* wilt of chickpea. *Phytopathology* 72:1035-1036.
- Kumar, J., Haware M.P. y Smithson J.B. 1985. Registration of our short duration *Fusarium* wilt-resistant kabuli (garbanzo) chickpea germplasm. *Crop Science* 25:576-577.

- Lairini, K. y Ruíz-Rubio M. 1998. Detoxification of the α -tomatine by *F. oxysporum* and *F. solani*. Mycological Research 192:1375-1380.
- Leslie, J.F. y Summerell B.A. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing Ltd. 2006.
- Li, D., Chung, K. R., Smith D. A. and Schardl, C. L. 1995. The *Fusarium solani* gene encoding kievitone hydratase, a secreted enzyme that catalyzes detoxification of a bean phytoalexin. Molecular Plant-Microbe Interactions 8: 388-397.
- Link, H.F. 1809. Observationes in ordinibus plantarum naturalium. Dissetatio I. Mag. Ges. Naturf. Freunde Berlin 3: 3-42. www.mycobank.org/biolomics.aspx.
- López-García, H. 1974. Inheritance of the character resistance to wilt (*Fusarium* sp.) in chickpea (*Cicer arietinum*) under field conditions. Agricultura Técnica en México 3:286-289.
- Luna-Páez, A., Silva-Rojas H.V., Marbán-Mendoza N. y Valadez-Moctezuma, E. 2004. Variabilidad genética de *Fusarium oxysporum* Schletend.: Fr. f. sp. *ciceris* (Padwick) Matuo y K. Sato mediante PCR-RAPD's en el Bajío, México. Revista Mexicana de Fitopatología 22 (1), 44-51.
- Marín, P. Análisis de factores ecofisiológicos que influyen en la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de toxinas en especies de "Fusarium". Facultad de Ciencias Biológicas, Depto. de Microbiología III. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España. Tesis doctoral. 2010.
- Mark, A.B., Abdel B., Howard F.S. y James K. 1996. Garbanzo Bean Production Trials In Colorado and Wyoming. Technical Bulletin 98-2, pp 1-26.

- Martínez, D.G. 2004. Combate de malezas. En: Morales, J., L., Durón, G., Martínez, J., Núñez y A. Fu. El cultivo del garbanzo blanco en Sonora. Libro técnico 6. CECH-CIRNO-INIFAP, pp. 145-168.
- Martin-Udiroz, M., Madrid M.P. y Roncero M.I.G. 2004. Role of chitin synthase genes in *Fusarium oxysporum*. *Microbiology* 150: 3175-3187.
- Mateo J.M. Leguminosas de Grano. Ed. Revolucionaria, La Habana, Cuba 1961.
- Mazur, S., Nawrocki J. y Kućmierz J. 2004. Disease symptoms on chickpea (*Cicer arietinum* L.) and their causal agents. *Horticulturae* 16 (1), 47-53.
- Mishra, P.K., Fox R.T.V. y Culham A. 2003. Development of a PCR based assay for rapid and reliable identification of pathogenic *Fusaria*. *FEMS Microbiology Letters* 218: 329-32.
- Montgomery, D.C. 2004. Diseño y Análisis de Experimentos. Editorial Limusa, S.A de C.V. México D.F. 686p
- Morales, G. J., Ortega M. P., Fu, C. A. y Grageda G. J. 1997. Guía botánica para la producción de garbanzo en la Costa de Hermosillo. Folleto para productores Num. 16. 26 p.
- Navas-Cortés, J.A., Alcalá-Jiménez A.R., Hau, B. y Jiménez-Díaz R.M. 2000. Influence of inoculum density of races 0 and 5 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* on development of *Fusarium* wilt in chickpea cultivar. *European Journal of Plant Pathology* 106:135-146.
- Navas-Cortés, J.A., Landa B.B., Méndez-Rodríguez M.A. y Jiménez-Díaz R.M. 2007. Quantitative modeling of the effects of temperature and inoculum density of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* races 0 and 5 on development of *Fusarium* wilt in chickpea cultivars. *Phytopathology* 97:564-573.

- Nelson, P.E., Toussoun T.A. y Cook R.J. (eds) 1981. *Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy*. University Park, PA, USA: The Pennsylvania University Press.
- Nene, Y.L. 1980. Diseases of chickpea. ICRISAT. Proc. Int. Workshop Improvement: 171-187. ICRISAT, Hyderabad, India.
- Nene, Y.L. y Reddy M.V. 1987. Chickpea diseases and their control. En: *The Chickpea*: 233-270. M. C. Saxena y K. B. Singh, eds. CAB International. Wallingford, Oxon, UK.
- O'Donnell, K.O., Kistler H.C., Cigelnik E. y Ploetz R.C. 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.
- Ortega-Murrieta, P.F., Manjarrez-Sandoval P., Fierros-Leyva G.A., Salinas-Pérez R., Padilla-Valenzuela I., Gutiérrez-Pérez, E. y Castillo-Torres N. Blanoro, nueva variedad de garbanzo para el Noroeste de México. En: *Memoria Simposio Nacional de Garbanzo 2013*. México. INIFAP pp 32-41.
- Padwick, G.W. 1940 a: The genus *Fusarium* III. A critical study of the fungus causing wilt of gram (*Cicer arietinum* L.) and of the related species of the subsection *Orthocera*, with special relation to the variability of key characteristics. *Indian J Agr Sri* 10: 241-284.
- Pande, S., Narayana R.J. y Sharma M. 2007. Establishment of the Chickpea Wilt Pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* in the Soil through Seed Transmission. *Plant Pathol J* 23 (1):3-6.

- Pande, S., Siddique K.H.M., Kishore G.K., Bayaa B., Gaur P.M., Gowda C.L.L., Bretag T.W. y Crouch, J.H. 2005. Ascochyta blight of chickpea (*Cicer arietinum* L.): a review of biology, pathogenicity, and disease management. Aust J Agric Res 56: 317-332.
- Pedroza-Sandoval, A. 2009. Monitoreo y escalas visuales en la evaluación de las enfermedades. En: Tópicos selectos de Estadística Aplicadas a la Fitosanidad. Editorial: CP, IPN, CIIDIR-PAXACA, 192-201 p.
- Pérez-Artés, E., Roncero M.I.G., Jiménez-Díaz R.M. 1995. Restriction fragment length polymorphism analysis of the mitochondrial DNA of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. J Phytopathol 143:105-109.
- Phillips, C.J. 1988. A distinct race of chickpea wilt in California. International Chickpea Newsletter 18:19-20.
- Raheja, P.C. y Das G.P. 1957. Development studies in crop plants II. Effect of cultural treatments on the incidence of gram wilt. Indian Journal of Agricultural Science 27:237-250.
- Reddy, M.V., Raju T.N. y Nene N.Y. 1990. Evaluation of chickpea lines in the All Indian Coordinated Varietal Trials for wilt and root rots resistance. International Chickpea Newsletter 23:22.
- Reznikov, S., Vellicce G.R., González V., García M.G., Rocha C.M., Ploper D. y Castagnaro A. 2013. Diversidad genética de aislamientos de *Macrophomina phaseolina* recolectados en la Argentina, determinada por marcadores AFLP. World Soybean Research Conference IX. Durban South Africa, 1-2.

- Roger, A.J., Sandblom O., Doolittle W.F. y Philippe H. 1999. An Evaluation of Elongation Factor 1-Alpha as a Phylogenetic Marker for Eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution* 16 (2):218-233.
- Rubio, J., Hajj M.E., Kharrat M., Moreno M.T., Millan T. y Gill J. 2003. Two genes and linked RAPD markers involved in resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* race 0 in chickpea. *Plant Breed* 122-188-191.
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2013. Disponible en internet:
<http://www.sagarpa.gob.mx/agricultura/Paginas/Agricultura.aspx>
- Sambrook, J y Rusell D. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press, Thirth Edition, New York, USA,
- Sánchez, F., T. 2002. Exportaciones record de garbanzo. *Agro-Red.III(23):1*.
- Sánchez-Montoya, T. El Sistema Producto Garbanzo del Estado de Sinaloa. En: *Memoria Simposio Nacional de Garbanzo 2013*. México. INIFAP pp 20-25.
- Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. *Catálogo Nacional de Variedades Vegetales (C.N.V.V.)*. 2010. Año 04, (03), pp1-28.
- Sharma, K. D., Chen W. and Muehlbauer F.J. 2005: Genetics of chickpea resistance to five races of *Fusarium* wilt and a concise set of race differentials for *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Plant Dis.* 89, 385—390.
- Sharma, K.D. y Muehlbauer F.J. 2007. *Fusarium* wilt of chickpea: physiological specialization, genetics of resistance and resistance gene tagging. *Euphytica* 157:1-14.

- Sharma, K.D., Weidong C. y Muehlbauer F. 2004. A consensus set of differentials lines for identifying races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. International Chickpea and Pigeonpea Newsletter 11:34-36.
- Sharma, K.D., Weidong C. y Muehlbauer F. 2005. Genetics of chickpea resistance to five races of *Fusarium* wilt and a concise set of race differentials for *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. Plant Dis 89, 4:385.
- Sharma, M., Varshney R.K., Rao J.N., Kannan S., Hoisington, D. y Pande, S. 2009. Genetic diversity in Indian isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, chickpea wilt pathogen African. Journal of Biotechnology 8 (6),1016-1023.
- Siddiqui, Z.A. y Akhtar M.S. 2007. Biocontrol of a Chickpea root-rot disease complex with phosphate-solubilizing microorganisms. 2007. Journal of Plant Pathology 89 (1), 67-77.
- Sidhu, J.S., Singh K.B. y Slinkard A.E. 1983. Inheritance of resistance to *Fusarium* wilt in chickpea. Journal of Heredity 74:68.
- Singh, K.B. y Dahiya K.B. 1973. Breeding for wilt resistance in chickpea. En: Symposium on wilt problems and breeding for wilt resistance in Bengal gram. Indian Agricultural Research Institute, New Delhi, India, pp13-14.
- Singh, K.B. y Reddy M.V. 1991. Advances in disease resistance breeding in chickpea. Advances in Agronomy 45:191-222.
- Singh, K.B. 1987. Chickpea breeding. En: The Chickpea: Saxena MC y Singh KB. (eds). CAB International. Wallingford, Oxon, UK pp 127-162.

- Smith, I. M., Dunez J., Lelliot R. A., Phillips D. H. y Archer S. A. 1988. Manual de enfermedades de las plantas. 1ra Edición. Editorial Blackwell Scientific Publications LTD. Oxford (UK). 627 p.
- Stepanova, M.Y. 1971. Spread of *Fusarium oxysporum* in legumes. Trudy Ves Inst Zashch 29:100.
- Stuteville, D.L., Graves W.L., Dixon L.J. y Minnis A.M. 2010. *Uromyces ciceris-arietini*, the Cause of Chickpea Rust: New Hosts in the Trifolieae, Fabacea. Plant Dis 94:293-297.
- Tantaoui, A., Ouiten M., Geiger J.P. y Fernández D. 1996. Characterization of a single clonal lineage of *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* causing bayoud disease of date palm in Morocco. Phytopathology 86:787-792.
- Tineo, G.H., Losano L. y Trujillo-Pinto G. 1988. Géneros de Bacterias Fitopatógenas Presentes en Semillas de Leguminosas Comestibles. Agronomía Tropical 38 (4-6): 85-94.
- Trapero-Casas, A. y Jiménez-Díaz R.M. 1985. Fungal wilt and root rot diseases of chickpea in southern Spain. Phytopathology 75: 1146-115.
- Trapero-Casas, A., Kaiser W.J. 1992. Development of *Didymella rabiei*, the teleomorph of *Ascochyta rabiei*, on chickpea straw. Phytopathology 82: 1261-1266.
- USDA-ARS, Beltsville. 2004. Phytochemical Databases: Chickpea. <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/duke/ethnobot.pl>.
- Van der Maesen, L.J.G. 1972: *Cicer* L, a monographed the genus, with special reference to the chickpea (*Cicer arietinum* L.), its ecology and cultivation. Commun Agrie Univ Wageningen 72: 342 pp.

- Velarde-Félix, S., Zamora-Galván F., Valdez-Rubio N., Cárdenas-Molina L., López-Molina, R., Angeles-Valdéz J.A., Fierros-Leyva G.A., Ortega-Murrieta P.F., Padilla-Valenzuela I. y Gutierrez-Pérez E. 2013. Distribución y presencia de la fusariosis del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en el Noroeste de México y búsqueda de resistencia en condiciones controladas. En: Memoria Simposio Nacional de Garbanzo 2013. México. INIFAP, pp 54-64.
- Wen, K., Seguin P., Arnaud S.M., Jabaji, H.S. 2005. Real-time quantitative RT-PCR of defense-associated gene transcripts of *Rhizoctonia solani* infected bean seedlings in response to inoculation with a nonpathogenic binucleate *Rhizoctonia* isolate. *Phytopathol* 95: 345-353.
- Westerlund, F.V., Campbell R.N. y Kimble K.A. Fungal Root Rot and Wilt of Chickpea in California. 1973. *Phytopathology* 64:432-436.
- Winter, P., Benko A.M., Hüttel B., Ratnaparkhe M., Tullu A., Sonnante G., Pfaff T., Tekeoglu M., Santra D., Sant V.J., Rajesh P.N., Kahl. y Muehlbauer F.J. 2000. A linkage map of the chickpea (*Cicer arietinum* L.) genome based on recombinant inbred lines from a *C. arietinum* X *C. reticulatum* cross: localization of resistance genes for fusarium wilt races 4 and 5. *Theor Appl Genet* 101:1155-1163.
- Wollenweber, H. W. and Reinking O.A. 1935. Die Fusarien, ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekämpfung. Verlag Paul Parey, Berlin, Germany.

ANEXOS

Anexo 1. Análisis de varianza

FV	GL	Cuadrados medios, severidad (%)	
		dds	
		43 s/transf	43 transf
A = Líneas	19	1751.37	10.29
Pr > F		< 0.0001	< 0.0001
B = Patógenos	2	14389.54	400.79
Pr > F		< 0.0001	< 0.0001
Interacción A * B (Líneas*Patógenos)	38	711.52	5.32
Pr > F		< 0.0001	< 0.0001
Error	120	172.83	2.06
Total	179	--	--
CV (%)		73.60	48.95
R ²		0.81	0.83