



**Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo**

**FACULTAD DE AGROBIOLOGÍA "PRESIDENTE JUÁREZ"**

**Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas  
Área Temática: Fisiología y Genética Vegetal**

# **T E S I S**

**IDENTIFICACIÓN DE *Fusarium* ASOCIADO A *Persea americana* Miller, VARIEDAD *drymifolia* (Schltdl. y Cham.) S.F. Blake**

**Que como requisito para obtener el grado de:  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Presenta:  
Guillermo Gregorio Olalde Lira**

**Tutora:  
Doctora en Ciencias Agrícolas  
Dra. Ma. Blanca Nieves Lara Chávez**

**Uruapan, Michoacán**

**Marzo de 2016**



## **AGRADECIMIENTOS**

Primeramente quiero agradecer a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo otorgado para la realización de este proyecto.

A mis padres, por la paciencia y el apoyo brindados durante todo este tiempo.

A mi tutora e integrantes de mi comité tutorial : Dra. Ma. Blanca Nieves Lara Chávez, MC. Teresita del Carmen Ávila Val, Dra. Maribel Gutiérrez Contreras, Dra. Margarita Vargas Sandoval y Dr. Héctor Guillén Andrade, por sus consejos y observaciones en este trabajo de investigación.

Un agradecimiento muy especial al Dr. Salvador Ochoa Ascencio por todo el material de apoyo, las dudas resueltas y los sabios consejos otorgados.

A mis compañeras Iltze Hernández Murguía, Susana Vega Hernández y Laura Figueroa Corona, por haber compartido estos dos años de aventuras y desventuras.

A Helena Aguilera Aguilera, gracias por estar ahí, por ser esa voz sabia (y dura) que muchas veces necesité... y que voy a seguir necesitando.

A Elva Alicia Cervantes Cárdenas, mi hermana en este proyecto, gracias por estar ahí haciendo mas ligera y divertida la carga de trabajo, me quedo con lo mejor de estos dos años... nos vemos en el doctorado.

**A MIS PADRES**

**Gracias por todo**

## INDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
HIPÓTESIS.....	4
OBJETIVO GENERAL.....	4
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	4
II. LITERATURA CITADA.....	5
<b>CAPÍTULO I: CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE ESPECIES DE <i>Fusarium</i> ASOCIADAS A <i>Persea americana</i> Miller, VARIEDAD <i>drymifolia</i> (Schltdl. Y Cham.) S.F. Blake.....</b>	<b>9</b>
RESUMEN.....	9
SUMMARY .....	10
I. INTRODUCCIÓN.....	11
II. MATERIALES Y MÉTODOS .....	14
Área de estudio y colecta .....	14
Ubicación del área experimental .....	14
Material biológico.....	14
Preparación de medios de cultivo .....	14
Obtención de aislamientos de <i>Fusarium</i> a partir del material vegetativo.....	15
Cultivos monoconidiales y preservación del fitopatógeno .....	15
Características culturales en medio de cultivo PDA.....	15
Características morfológicas en medio de cultivo CLA.....	16
Tasa de crecimiento.....	16
Dendrograma de caracteres culturales y morfológicos.....	16
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	17
Zonas de muestreo .....	17
Aislamiento y purificación de <i>Fusarium</i> spp. ....	18
Caracterización cultural.....	18
Tasa de crecimiento.....	19
Características morfológicas en medio de cultivo CLA.....	19
Análisis de datos .....	23
IV. CONCLUSIONES.....	28
V. LITERATURA CITADA .....	29
<b>CAPÍTULO II: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE <i>Fusarium</i> ASOCIADO A RAÍZ DE <i>Persea americana</i> Mill. var. <i>drymifolia</i> (Schltdl. y Cham.) S.F. Blake ...</b>	<b>33</b>
RESUMEN.....	33
SUMMARY .....	34
I. INTRODUCCIÓN.....	35
II. MATERIALES Y MÉTODOS .....	36
Colecta y aislamiento de <i>Fusarium</i> spp. ....	37
Ubicación del área experimental .....	37
Extracción de ácidos nucleicos.....	38
Cuantificación y análisis de calidad del ADN .....	38
Reacción en cadena de la polimerasa .....	38

Secuenciación .....	38
Cálculo de distancias genéticas.....	39
Contenido de GC .....	39
Análisis filogenético .....	39
<b>III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>40</b>
Cuantificación y calidad de ácidos nucleicos .....	40
Reacción en cadena de la polimerasa .....	40
Estimación de distancias genéticas .....	40
Estimación de porcentajes de GC.....	41
Análisis filogenético .....	42
<b>IV. CONCLUSIONES .....</b>	<b>48</b>
<b>V. LITERATURA CITADA .....</b>	<b>49</b>
<b>CAPÍTULO III: PATOGENICIDAD DE <i>Fusarium</i> spp. ASOCIADAS A RAIZ DE</b>	
<b><i>Persea americana</i> Miller, VARIEDAD <i>drymifolia</i> (Schltdl. y Cham.) S.F. Blake ...</b>	<b>53</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>53</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>54</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>55</b>
<b>II. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>58</b>
<b>Colecta y aislamiento de <i>Fusarium</i> spp. ....</b>	<b>58</b>
<b>Purificación de los aislados.....</b>	<b>59</b>
<b>Identificación de <i>Fusarium</i> spp. ....</b>	<b>59</b>
<b>Preparación del sustrato .....</b>	<b>59</b>
<b>Obtención del material vegetativo .....</b>	<b>59</b>
<b>Preparación del inóculo.....</b>	<b>60</b>
<b>Inoculación.....</b>	<b>60</b>
<b>Variables respuesta .....</b>	<b>60</b>
<b>Análisis de la información.....</b>	<b>60</b>
<b>III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>61</b>
<b>Identificación de <i>Fusarium</i> spp. ....</b>	<b>61</b>
<b>Pruebas de patogenicidad .....</b>	<b>61</b>
<b>Virulencia de los aislado .....</b>	<b>61</b>
<b>Evaluación de la severidad de la enfermedad .....</b>	<b>64</b>
<b>IV. CONCLUSIONES .....</b>	<b>69</b>
<b>V. LITERATURA CITADA .....</b>	<b>70</b>
<b>CONCLUSIONES GENERALES .....</b>	<b>75</b>
<b>APÉNDICE .....</b>	<b>76</b>

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Colecta de raíces con síntomas de pudrición: a) Toma de la muestra. b) Raíces de aguacate con síntomas de pudrición.....	17
Figura 2. Comparación de 19 aislados de <i>Fusarium</i> en medio de cultivo PDA, obtenidos de 10 localidades pertenecientes a la franja aguacatera del estado de Michoacán. ....	20
Figura 3. A) Microconidios, B) Hifas enrolladas, C) Microconidios, D) Clamidosporas. ....	23
Figura 4. Sedimentación de la variabilidad acumulada en los 15 componentes principales obtenidos del análisis de características morfológicas y culturales. Se tomaron en cuenta los primeros 5 componentes principales, representantes del 87 % de la variabilidad. ....	25
Figura 5. Proyección de la distribución de los componentes principales obtenida con base en el análisis de características morfológicas. ....	25
Figura 6. Dendrograma cluster de distribución jerárquica derivado del análisis de 19 cepas de <i>Fusarium</i> con base en 5 componentes principales, representantes del 87 % de la variabilidad acumulada.....	26
Figura 7. Proyección de las 19 cepas de <i>Fusarium</i> spp. en el plano de los componentes principales 1 y 2 obtenidos del análisis de componentes principales para los caracteres morfológicos y culturales. ....	27
Figura 8. Análisis biplot representativo de la correlación entre los agrupamientos presentados en el análisis jerárquico de cluster y el análisis de componentes principales. ....	27
Figura 9: Visualización de ácidos nucleicos de 19 cepas.....	40
Figura 10: Amplificación del gen codificante del factor de elongación en gel de agarosa 2%.....	41
Figura 11: Amplificación del gen codificante para calmodulina en gel de agarosa 2 %. ....	41

Figura 12: Cladograma producto del análisis de secuencias de <i>Fusarium</i> codificantes de calmodulina en base a máxima parsimonia con 500 repeticiones en bootstrap. ....	44
Figura 13: Cladograma producto del análisis de secuencias de <i>Fusarium</i> codificantes de calmodulina en base a máxima verosimilitud con 500 repeticiones en bootstrap. ....	45
Figura 14. Cladograma representativo del análisis de secuencias de <i>Fusarium</i> codificantes para factor de elongación realizado en base a máxima parsimonia con 500 repeticiones en bootstrap. ....	46
Figura 15. Cladograma representativo del análisis de secuencias de <i>Fusarium</i> codificantes para Factor de elongación realizado en base a Máxima verosimilitud con 500 repeticiones en bootstrap. ....	47
Figura 16. Síntomas observados en raíz de aguacate <i>Persea americana</i> Mill. variedad <i>drymifolia</i> ocasionados por las cepas de <i>Fusarium oxysporum</i> y <i>F. solani</i> . ....	65
Figura 17. Síntomas observados en planta de aguacate <i>Persea americana</i> Mill. var <i>drymifolia</i> ocasionados por las cepas de <i>Fusarium oxysporum</i> y <i>F. solani</i> . ....	66
Figura 18. Síntomas observados en el brote apical de plantas de aguacate <i>Persea americana</i> Mill. var <i>drymifolia</i> ocasionados por las cepas de <i>Fusarium oxysporum</i> y <i>F. solani</i> . ....	67
Figura 19. Escala visual para determinar la severidad de la enfermedad. A) Planta sana, B) Amarillamiento, C) Marchitez, D) Necrosis apical. ....	68
Figura 20. Histograma de frecuencias para evaluación de la severidad de la enfermedad de los 19 aislados de <i>Fusarium</i> y un testigo .....	68

## INDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Localización geográfica de 10 sitios de muestreo en localidades pertenecientes a la franja aguacatera del estado de Michoacán. ....	17
Cuadro 2. Localización geográfica del sitio de colecta de 19 aislados de <i>Fusarium</i> . 18	
Cuadro 3. Características morfológicas y culturales de 19 cepas de <i>Fusarium</i> . ....	24
Cuadro 4: Sitios de colecta de 19 aislados de <i>Fusarium</i> obtenidos localidades pertenecientes a la franja aguacatera del estado de Michoacán. ....	37
Cuadro 5: Distancias genéticas entre aislados, F1 a F19 representan los 19 aislados de <i>Fusarium</i> , XT representa el grupo externo conformado por <i>Fusarium graminearum</i> . ....	41
Cuadro 6: Porcentajes de GC en las secuencias de los 19 aislados de <i>Fusarium</i> y el grupo externo <i>F. graminearum</i> . ....	42
Cuadro 7: Secuencias codificantes para el factor de elongación obtenidas del Genbank. ....	42
Cuadro 8: Secuencias codificantes para calmodulina obtenidas del Genbank. ....	43
Cuadro 9. Localización geográfica de 10 sitios de muestreo en localidades pertenecientes a la franja aguacatera del estado de Michoacán. ....	58
Cuadro 10. Concentración de conidios, virulencia y severidad de la enfermedad de 19 cpeas de <i>Fusarium</i> sp. ....	62
Cuadro 11. Comparación de medias (Tukey $\alpha=0.05$ %) para virulencia de 20 tratamientos correspondientes a 19 cepas de <i>Fusarium</i> y un testigo. ....	63



## RESUMEN GENERAL

El presente estudio se planteó con el objetivo de aislar, caracterizar morfológicamente y molecularmente, así como evaluar la patogenicidad de *Fusarium* spp. Asociadas a raíz de *Persea americana* Miller, variedad *drymifolia* (Schltdl. Y Cham.) S.F. Blake, en el estado de Michoacán. Se realizaron 10 colectas en localidades pertenecientes a la franja aguacatera del estado de Michoacán y se obtuvieron 19 aislados de *Fusarium* spp. La caracterización morfológica se realizó en base a sus características culturales en medio de nutritivo PDA y tasa de crecimiento, posteriormente se determinaron las características microscópicas como microconidios, macroconidios, clamidosporas y presencia de hifas enrolladas en medio de cultivo CLA. Para la caracterización molecular se realizó la extracción de ADN de acuerdo al protocolo descrito por Cenis (1992), posteriormente se hizo una PCR con base en los iniciadores que codifican para factor de elongación y calmodulina, los fragmentos obtenidos se purificaron y secuenciaron en MacroGen Inc. Estas secuencias se compararon en homología por medio de análisis BLAST y se obtuvieron aquellas que presentaron mayor similitud, el total de las secuencias se alineó en MEGA 6.0 para la búsqueda del mejor modelo evolutivo, distancias genéticas y la construcción de cladogramas en base a máxima parsimonia y máxima verisimilitud. Posteriormente se evaluó la patogenicidad de estas cepas para determinar la interacción cepa-hospedero en pruebas realizadas en plantas de aguacate provenientes de un mismo árbol, éstas se sembraron en un sustrato estéril a base de arena y después de tres meses se inocularon con soluciones conidiales de las cepas de *Fusarium* spp. Se evaluó la virulencia de acuerdo al tiempo que tardaron en presentar el primer síntoma, así como la severidad por los daños que produjeron en raíz y ápice en comparación a los testigos. Los análisis morfológicos y moleculares concluyeron que las 15 cepas pertenecen a *Fusarium oxysporum* Schl. Y las cuatro restantes a *Fusarium solani*, Mart. La evaluación patogénica determinó que todas las cepas fueron patogénicas, presentaron una virulencia que osciló en los 16 a 56 días. El total de las cepas fue capaz de producir pudrición radical, así como amarillamiento de las hojas, marchitez en el 63 % de los tratamientos y necrosis apical en el 16 %, siendo este el síntoma mas severo.

**Palabras clave:** Aguacate, *Fusarium oxysporum* Schl., *Fusarium solani* Mart.

## SUMMARY

This study is proposed in order to isolate and characterize morphologically and molecularly, and evaluate the pathogenicity of *Fusarium* spp. Associated to roots of *Persea americana* Miller, *drymifolia* variety (Schltdl. And Cham.) S.F. Blake, in Michoacan, Mexico. 10 samples were taken from localities belonging to the avocado strip the state of Michoacan and were obtained 19 isolates of *Fusarium* spp. The morphological characterization was carried out based on their cultural characteristics on nutrient PDA and growth rate, the microscopic characteristics as microconidia, macroconidia, chlamydospores and coiled hyphae in culture medium CLA was subsequently determined. For molecular characterization, a DNA extraction according to the protocol described by Cenis (1992) was performed, subsequently became a PCR based on primers encoding elongation factor and calmodulin, the fragments obtained were purified and sequenced in Macrogen Inc. These sequences were compared for homology using BLAST analysis and those that showed greater similarity were obtained, total sequences lined up in MEGA 6.0 for finding the best evolutionary model, genetic distances and building cladograms based on maximum parsimony and maximum likelihood. Subsequently the pathogenicity of these strains were evaluated for strain-host interaction tests on avocado plants from the same tree, they were seeded in a sterile substrate based on sand and after three months were inoculated with conidial solutions strains of *Fusarium* spp. Virulence was evaluated according to the time it took to present the first symptom and severity for damage that occurred in root and apex compared to controls. Morphological and molecular analysis concluded that 15 strains belong to *Fusarium oxysporum* Schl. And the remaining four to *Fusarium solani*, Mart. The pathogenetic evaluation found that all of them were pathogenic strains, they showed a virulence which ranged in 16-56 days. The total of the strains was able to produce root rot and leaf yellowing, wilting in 63% of treatments and apical necrosis in 16%, being the most severe symptom.

**Keywords:** Avocado, *Fusarium oxysporum* Schl., *Fusarium solani* Mart.

## I. INTRODUCCIÓN GENERAL

El cultivo del aguacate, para Michoacán, representa la actividad agrícola mas importante tanto en el aspecto económico como en el social, ya que en esta entidad se cultiva la mayor extensión de aguacate del país (Guillén-Andrade *et al.*, 2007). El proceso de la cadena productiva de este cultivo es una de las actividades económicamente más importantes de México, genera 47 mil empleos directos y 70 mil empleos estacionales, equivalentes a 10.5 millones de jornales anuales, además de 187 mil empleos indirectos permanentes (Téliz y Marroquín, 2007). Actualmente es el principal productor a nivel mundial; lugar que obtiene por las 168,114 ha plantadas con una producción total de 1,467,837 t (SIAP, 2014).

Sin embargo, este cultivo ha pasado por cambios genéticos y fisiológicos, derivados del establecimiento masivo y manejo intensivo de sus sistemas de producción. Así, dentro de los factores que limitan la productividad del árbol de aguacate se encuentran los abióticos y bióticos, en los primeros destacan los tipos de suelo y clima, entre los que se consideran el drenaje, contenido de nutrientes, materia orgánica, pH, textura, estructura, temperatura y profundidad del perfil, la velocidad del viento, intensidad lumínica, temperatura y distribución estacional, latitud, altitud, así como la cantidad de precipitación pluvial. Por otra parte, en los abióticos se encuentran hongos, nematodos, bacterias, virus y algas, algunos de los cuales no habían sido considerados porque no representaban un riesgo para el cultivo (Téliz y Mora, 2007; Whiley *et al.*, 2007).

Las enfermedades en las plantas ocasionadas por especies de *Fusarium* en los trópicos están tomando mayor importancia con la introducción de sistemas de producción de alto rendimiento y cultivares genéticamente uniformes (Salleh, 1994).

El género *Fusarium* fue introducido por Link en 1809, pertenece al phylum Ascomycota, clase Ascomycete y orden Hypocreales (Leslie, 1995). Se ubica como uno de los grupos mas importantes y numerosos por su patogenicidad, tal como lo demuestra la reciente encuesta entre la comunidad internacional de fitopatólogos,

donde dos especies de *Fusarium*, *F. oxysporum* Schl. y *F. graminearum* Sch., se ubicaron entre los 10 patógenos de mayor importancia económica y científica (Geiser, 2013).

Las especies de este género están ampliamente distribuidas en el suelo y en sustratos orgánicos, así como en partes aéreas de las plantas afectadas (Booth, 1986). Como muchos hongos del suelo, este género está ampliamente dotado con formas de sobrevivencia y una alta capacidad para adaptarse a nuevos hospederos (Ortoneda *et al.*, 2003). Las especies de *Fusarium* en los trópicos son bastante diversas en términos de número, distribución, rango de hospederos y virulencia (Summerell *et al.*, 2003).

El género *Fusarium* se encuentra comúnmente asociado a la inducción de enfermedades en plantas perennes tropicales, ocasiona pudriciones en coronas, yemas y raíces (Leslie y Summerell, 2006), evidente disminución de su porte, vigor y producción (Ploetz, 2007) así como presencia de hiperplasia y/o hipertrofia en los tejidos. Las enfermedades vasculares producidas por este género reducen la capacidad de traslocación de agua y nutrimentos en la planta más del 95 %, lo que ocasiona marchitez en un inicio y eventualmente la muerte de las mismas. En cultivos de importancia económica produce pérdidas millonarias para la economía agrícola mundial (Aoki *et al.*, 2014; Agrios, 2005). *Fusarium oxysporum* y *F. solani* son los patógenos de plantas mas comunes en los trópicos y la marchitez vascular que ocasionan es la enfermedad económicamente mas importante (Summerell *et al.*, 2003).

Los síntomas ocasionados por *Fusarium* spp. en aguacate son amarillamientos de las hojas, interrupción del crecimiento de los flujos vegetativos, hojas pequeñas y caída prematura de éstas, si la pudrición es severa los árboles pueden morir semanas después de que aparecieron los primeros síntomas foliares, o pueden sobrevivir por largos periodos. A nivel radicular los síntomas observados son pudriciones de raíces pequeñas con una tonalidad café oscuro-negro que al paso del tiempo invaden las raíces más gruesas. Los síntomas descritos difieren de los causados por *Phytophthora*

*cinnamomi*, *Armillaria mellea* o *Rosselinia* sp., debido a la ausencia de rizomorfos, o de micelio blanco en abundancia, características de estas especies (Pegg *et al.*, 2007).

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

A menudo, son utilizados marcadores moleculares para la caracterización de especies de *Fusarium*, usualmente secuencias de ADN, y por lo tanto se dispone de caracteres relevantes, independientemente del estatus morfológico y/o fertilidad sexual de la cepa. Sin embargo, actualmente se utiliza información molecular, en combinación con caracteres morfológicos distintivos, para identificar grupos que anteriormente fueran descritos como especies separadas (Marasas *et al.*, 2001; Zeller *et al.*, 2003).

Las técnicas basadas en el ADN se han convertido en la herramienta por excelencia para la cuantificación y entendimiento de la diversidad genética y filogenia de especies de *Fusarium*, ha sido utilizada, por ejemplo, para revelar un gran número de especies en los complejos de *Fusarium solani* (O'Donnell, 2000), *F. avenaceum* (Yli-Mattila *et al.*, 2002), *F. graminearum* (O'Donnell *et al.*, 2000) y *F. oxysporum* (O'Donnell *et al.*, 1998).

Existen trabajos de investigación que indican diferencias genéticas en cuanto a la sensibilidad de diferentes portainjertos de *Persea americana* a fitopatógenos de raíz, donde han determinado que solamente han sido tolerantes a un fitopatógeno pero sensibles a otros, o bien, sensibles a la mayoría de ellos (Lahav y Lavi, 2007). Actualmente no existe información documentada sobre la presencia, sintomatología y

daños ocasionados por el género *Fusarium* en el cultivo del aguacate, con base en esto se plantearon la siguiente hipótesis y objetivos para el presente trabajo de investigación:

## **HIPÓTESIS**

En la franja aguacatera del estado de Michoacán *Fusarium* se encuentra asociado a *Persea americana* Miller, variedad *drymifolia*

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la presencia de *Fusarium* en *Persea americana* Miller, variedad *drymifolia* en la franja aguacatera del estado de Michoacán

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Obtener cepas de raíces de *Persea americana* Miller, variedad *drymifolia* con síntomas de pudrición.
- Caracterizar morfológicamente y molecularmente las cepas obtenidas a partir de raíces de *Persea americana* Miller, variedad *drymifolia*.
- Identificar el agente causal de la pudrición de raíces de *Persea americana* Miller, variedad *drymifolia* de las cepas caracterizadas.
- Determinar la patogenicidad de las cepas caracterizadas e identificadas.

## II. LITERATURA CITADA

- Agrios, N. G. 2005. **Plant Pathology**. Department of Plant Pathology University of Florida. Fifth edition. Elsevier Academic Press. USA. 922 p.
- Aoki, T., O'Donnell, K., Geiser, M. D. 2014. **Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: Current status and future challenges**. Journal of General Plant Pathology, 80:189-201.
- Booth, C. 1986. **The genus *Fusarium***. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Reino Unido. 237 p.
- Geiser, M. D., Aoki, T., Bacon, W. C., Baker, E. S., Bhattacharyya, K., Brandt, E., Brown, W., Burgess, W., Chulze, S., Coleman, J., Correll, J., Covert, S., Crous, W. P., Cuomo, A. C., Sybern de Hoog, G., Di-Pietro, A., Elmer, H. W., Epstein, L., Frandsen, J. N., Freeman, S., Gagkaeva, T., Glenn, A., Gordon, T., Gregory F. N., Hammond-Kosack, K., Hanson, E. L., Jimenez-Gasco, M., Kang, S., Kistler, C., Kaldau, G., Leslie, F. J., Logrieco, A., Lu, G., Lysøe, E., Ma, L., McCormick, S., Mmigheli, Q., Moretti, A., Munaut, F., O'Donnell, K., Pfenning, L., Ploetz, C. R., Proctor, H. R., Rehner, A. S., Robert, A. R. G., Rooney, A., Salleh, B., Scandiani, M. M., Scauflaire, J., Short, P. G. D., Steenkamp, E., Suga, H., Summerell, B., Sutton, A. D., Thrane, U., Trail, F., Diepeningen, V. A., VanEtten, D. H., Viljoen, A., Waalwijk, C., Ward, J. T., Wingfield, J. M., Xu, J., Yang, B., Yli-Mattila, T., Zhang, N. 2013. **One Fungus, One Name; Defining the Genus *Fusarium* in a Scientifically Robust Way That Preserves Longstanding Use**. Phytopathology, 103:400-408.
- Guillén, A. H., Lara, C. B. N., Gutiérrez, C. M., Ortíz, C. M., Angel, P. E. 2007. **Cartografía Agroecológica del Cultivo del Aguacate en Michoacán**. Morevallado Editores de Morelia, Michoacán, México. 141p.

- Lahav, E. y Lavi, A. W. 2007. **El Palto Botánica, Producción y Usos**. Traducción 1a ed. Ediciones Universitarias de Valparaíso. Litogarín, Valparaíso. pp. 241-274.
- Leslie, J. F. 1995. ***Gibberella fujikuroi*: Available populations and variable traits**. Canadian Journal of Botany. (73):282-291.
- Leslie, J. F. and Summerell, B. A. 2006. **The *Fusarium* Laboratory Manual**. Blackwell Publishing. Iowa, USA. 387 p.
- Marasas, W. F., Rheeder, J. P., Lamprecht, S. C., Zeller, K. A., Leslie, J. F. 2001. ***Fusarium andiyazi* sp. nov., a new species from sorghum**. Mycologia (93):1203-1210.
- Moretti, A., Mulé, G., Susca, A., González, M. T., Logrieco, A. 2004. **Toxin Profile, Fertility and AFLP analysis of *Fusarium verticillioides* from banana fruits**. European Journal of Plant Pathology. (110):601-609.
- O'Donnell, K. 2000. **Molecular phylogeny of *Nectria hematococca*-*Fusarium solani* species complex**. Mycologia (92):919-938.
- O'Donnell, K., Nirenberg, H. I., Aoiki, T., Cigelnik, E. 2000. **A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: Detection of additionally phylogenetically distinct species**. Mycoscience (41):61-78.
- Ortoneda, M., Guarro, J., Madrid, M. P., Caracuel, Z., Roncero, G. M., Mayayo, E., Di Pietro, A. 2003. ***Fusarium oxysporum* as a Multihost Model for Genetic Dissection of Fungal Virulence in Plants and Mammals**. Infection and Immunity. (72):60-66.



- Pegg, K. G., Coates, L. M., Korsten, L., y Harding, R. M. 2007. **Enfermedades foliares, del fruto y el suelo**. En: Whaley, A. W., Schaffer, B., y Wolstenholme, B. N. 2007. **El Palto Botánica, Producción y Usos**. Traducción 1a ed. Ediciones Universitarias de Valparaíso. Litogarín, Valparaíso. pp. 275-310.
- Ploetz, R. C. 2007. **Diseases of tropical perennial crops: Challenging problems in diverse environments**, Plant Disease, 91:644-663.
- Salleh, B. 1994. **Current Status and Control of Plant Diseases caused by *Fusarium* in Malaysia**. En **Biology and Control of Crop Pathogens**. Rifai, M. A., Scott, E. S., Quebral, F. C., Dharmaputra, O. S. Biotrop Special Publication No. 54. Biotrop, Bogor, Indonesia.
- Shahnazi, S., Meon, S., Vadamalai, G., Ahmad, K., Nejat, N. 2012. **Morphological and molecular characterization of *Fusarium spp.* associated with yellowing disease of black pepper (*Piper nigrum* L.) in Malaysia**. Journal of General Plant Pathology. (78):160-169.
- SIAP. 2015. **Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera**. <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/> (Accesado en enero de 2016).
- Summerell, A. B., Salleh, B. Leslie, F. J. 2003. **A Utilitarian Approach to *Fusarium* Identification**. Plant Disease. (87):117-128.
- Téliz, O. D y Mora, A. A. 2007. **Enfermedades del aguacate**. En: Téliz, O. D y Mora, A. A. **El aguacate y su manejo integrado**. 2<sup>a</sup> ed. Mundi Prensa. Ixtapaluca, Edo. De México. pp. 171-205.

Téliz, O. D. y Marroquín, P. F.J. 2007. **Importancia histórica y socioeconómica del aguacate**. En: Téliz, O. D y Mora, A. A. **El aguacate y su manejo integrado**. 2<sup>a</sup> ed. Mundi Prensa. Ixtapaluca, Edo. De México. pp. 1-28.

Thrane, U. **Developments in the taxonomy of Fusarium species based on secondary metabolites**. 2001. 29:49 pp en *Fusarium*: Paul E. Nelson Memorial Symposium. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.

Yli-Mattila, T.; Mach, R. L.; Alekhina, I. A.; Bulat, S. A.; Koskinen, S.; Kullnig-GRadinger, C. M.; Kubicek, C. P.; Klemsdal, S. S. 2004. **Phylogenetic Relationship of *Fusarium langsethiae* to *Fusarium poae* and *Fusarium sporotrichioides* as inferred by IGS, ITS and B-tubulin sequences and UP-PCR hybridization analysis**. International Journal of Food Microbiology (95):267-285

Zeller, K. A., Bowden, R. L., Leslie, J. F. 2003. **Diversity of epidemic populations of *Gibberella zeae* from small quadrats in Kansas and North Dakota**.

**CAPÍTULO I: CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE ESPECIES DE *Fusarium*  
ASOCIADAS A *Persea americana* Miller, VARIEDAD *drymifolia* (Schltdl. Y  
Cham.) S.F. Blake**

**RESUMEN**

En el presente trabajo de investigación se planteó el objetivo de aislar y caracterizar morfológicamente especies del género *Fusarium* asociadas al cultivo del aguacate en el estado de Michoacán. Se realizaron 10 colectas de raíz de árboles con síntomas de marchitez en localidades pertenecientes a la franja aguacatera del estado de Michoacán, las muestras fueron llevadas al laboratorio de fitopatología de la facultad de Agrobiología "Presidente Juárez" de la UMSNH, donde se obtuvieron 19 aislados que se almacenaron en cultivos monoconidiales en glicerol al 25 %. Se realizó una caracterización cultural en medio de cultivo PDA, evaluándose el tipo de micelio, coloración y tasa de crecimiento, morfológica en medio de cultivo CLA determinándose características microscópicas; microconidios y macroconidios así como la presencia o ausencia de clamidosporas e hifas enrolladas. En la caracterización cultural todas las cepas presentaron micelio abundante y denso, la tasa de crecimiento osciló entre los 1.65 y 5.13 mm por día. En la morfológica se observaron microconidios ovalados, sin septos y dispuestos en falsas cabezas en los 19 aislados, dos tipos de macroconidios distintos, con 3 y 5 septos, de forma alargada casi rectos y ligeramente curvados en los extremos. Clamidosporas globosas y lisas, dispuestas de manera intercalar y terminal en las hifas y presencia de hifas enrolladas solo en cuatro de los 19 aislamientos. El análisis de componentes principales y la proyección de los aislados indico que hay variabilidad morfológica entre ellos. De acuerdo a estos resultados se identificaron las especies *Fusarium aff. oxysporum* Schl. y *Fusarium aff. solani* Mart., asociadas a raíz de aguacate.

**Palabras clave:** *Fusarium*, Caracterización morfológica, Aguacate.

## SUMMARY

This research was conducted to isolate and characterize morphologically *Fusarium* species associated with the cultivation of avocado in Michoacan. 10 samples root trees with symptoms of wilt in localities belonging to the avocado strip the state of Michoacan were conducted, samples were taken to the laboratory of plant pathology in the faculty of agronomy "Presidente Juarez" UMSNH, which were obtained 19 isolates that were stored in monoconidial cultures in 25% glycerol. A cultural characterization was performed on PDA culture medium, evaluating the type of mycelium, color and growth rate, morphology in culture medium CLA microscopic characteristics determined were microconidia, macroconidia and the presence or absence of chlamydospores and coiled hyphae. Cultural characterization in all strains showed abundant and dense mycelium, the growth rate varied between 1.65 and 5.13 mm per day. In the morphological characterization, oval microconidia without septa and arranged in false heads were observed in the 19 isolates, two different types of macroconidia, with 3 and 5 septa, elongated almost straight and slightly crooked at the ends. Globose and smooth chlamydospores arranged intercalate and terminal in the hyphae and presence of coiled hyphae in only four of 19 isolates. The principal components analysis and projection of the isolates indicated that there were morphological variability among them. According to these results, *Fusarium aff. oxysporum* Schl. And *Fusarium aff. solani* Mart. Were indentied associated with avocado root.

**Keywords:** *Fusarium*, Morphological characterization, Avocado.

## I. INTRODUCCIÓN

*Fusarium* es el género de hongos más heterogéneo y la clasificación de especies en ocasiones se dificulta. Desde 1980 el número de especies reconocidas ha incrementado gradualmente, contando con más de 80 en los últimos registros. Actualmente la diferenciación de las especies de *Fusarium* está basada en las características morfológicas como la forma y tamaño de macroconidios y microconidios, presencia de clamidosporas, morfología de la colonia. Diferencias sutiles en una característica pueden diferenciar una especie de otra (Windels, 1992; Bluhm *et al.*, 2002). Sin embargo, este género carece de una gran cantidad de caracteres morfológicos que puedan utilizarse para diferenciar especies fácilmente y no es poco común “Quedarse sin caracteres antes que quedarse sin especies” (Leslie y Summerell, 2006). *Fusarium* posee diversidad de caracteres que pueden ser usados para diferenciarlo de otros géneros; sin embargo, las diferencias entre las especies pueden resultar complicadas, aunque muchos conceptos morfológicos han cambiado, otros han permanecido estables aún cuando son confrontados con criterios genéticos y moleculares (Leslie y Summerell, 2006).

En medio de cultivo *Fusarium* presenta un patrón de crecimiento radial en sus colonias, extenso y algodonoso, incoloro en un principio conforme madura adquiere un color blanco, crema, amarillo, rosa hasta púrpura o una gama de estos, su micelio es aéreo y septado (Leslie y Summerell, 2006).

Los macroconidios son las esporas típicas de *Fusarium*, están constituidas por tres o más células, que se adelgazan gradualmente y se encorvan hacia ambos extremos. Aparecen con gran frecuencia sobre la superficie de plantas que han sido destruidas por el patógeno, estos macroconidios son producidos en una estructura especializada, llamada esporodoquio, una masa de monofiálides cortas que sostienen los macroconidios. Además pueden producirse en el micelio aéreo, ya sea en monofiálides o polifiálides (Díaz de Castro *et al.*, 2007).

Los microconidios son producidos en el micelio aéreo e inmersos en el medio de cultivo, solos o en cadenas, tienen una a dos células y son las esporas que el hongo

produce con mayor abundancia en todas las condiciones. Estas esporas son las que el hongo forma con más frecuencia en el interior de los vasos de las plantas infectadas (Díaz de Castro *et al.*, 2007).

Las clamidosporas son estructuras de pared gruesa lisa o rugosa y contienen material lipídico que le permite al hongo sobrevivir en situaciones adversas. Pueden estar solas, en pares, cadenas o grupos. Estas esporas llegan a sobrevivir en el suelo durante varios años (Díaz de Castro *et al.*, 2007).

Adicionalmente a los macroconidios, microconidios y clamidosporas, otros caracteres han sido utilizados para la identificación de especies, como es el caso de las hifas enrolladas, las cuales son importantes para algunas especies, particularmente *Fusarium circinatum*, dentro del complejo de especies de *Giberella fujikuroi* (Leslie y Summerell, 2006).

Se han utilizado distintos medios de cultivo a base de agar como estándares para el crecimiento de colonias para la identificación de *Fusarium*, estas especies presentan fenotipos notoriamente variables en diferentes medios de cultivo (Burgess *et al.*, 1991). El principio básico de la identificación morfológica se da al seguir los mismos protocolos propuestos por Leslie y Summerell (2006) para la caracterización de las especies del género. De tal forma, los medios de cultivo estándar utilizados para la identificación de las especies de *Fusarium* son Hoja de Clavel-Agar (CLA), Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA) y Papa Dextrosa Agar (PDA).

Hoja de clavel-Agar (CLA) es un medio de cultivo compuesto de un sustrato natural, la mayoría de las especies de *Fusarium* esporulan en este medio en 6-10 días, produciendo macroconidios mas uniformes en tamaño y forma que aquellos en medios ricos en carbohidratos, como PDA (Leslie y Summerell, 2006).

Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA) es un medio de cultivo escaso en nutrientes utilizado para la identificación y preservación de líneas de *Fusarium*. La degradación del hongo es muy común en distintos medios de cultivo sintéticos, lo que no ocurre en SNA. Este medio promueve la esporulación y el desarrollo de células conidiógenas,

sin embargo, la morfología macroconidial no es tan uniforme como en CLA (Leslie y Summerell, 2006).

Papa Dextrosa Agar (PDA) es un medio de cultivo rico en carbohidratos, los conidios formados en este medio no son tan consistentes en tamaño y forma, como los formados en CLA o SNA. Sin embargo, la morfología de la colonia, pigmentación y tasa de crecimiento de la mayoría de las especies de *Fusarium* son relativamente consistentes si el medio se elabora de manera estandarizada. Estas características de la colonia son criterios secundarios útiles para la identificación (Leslie y Summerell, 2006), de acuerdo a lo anterior los objetivos de esta investigación son:

- Colectar y aislar al género *Fusarium* asociado a raíz de *Persea americana* Miller, variedad *drymifolia* (Schltdl. Y Cham.) S.F. Blake.
- Caracterizar morfológicamente las cepas obtenidas a partir de raíces de de *Persea americana* Miller, variedad *drymifolia* (Schltdl. Y Cham.) S.F. Blake

## **II. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Área de estudio y colecta**

Se realizaron muestreos dirigidos en 10 localidades con diferente altitud dentro de la franja aguacatera del estado de Michoacán, en diferentes zonas agroecológicas (Gutiérrez *et al.*, 2010), en cada sitio se tomaron las lecturas de localización y altura con ayuda de un GPS Garmin Oregon 450.

### **Ubicación del área experimental**

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

### **Material biológico**

De cada sitio de muestreo se tomaron tres muestras de raíz de árboles que presentaban síntomas de marchitez (árboles con amarillamiento foliar, hojas pequeñas y ausencia de raíces alimenticias, las raíces más gruesas con coloración café oscuro a negro), éstas se depositaron en bolsas de plástico Ziploc® junto con una muestra del sustrato de donde se extrajo para mantenerlas húmedas posteriormente fueron etiquetadas de acuerdo al orden de la colecta.

### **Preparación de medios de cultivo**

Se prepararon volúmenes de 500 mL para el medio PDA mientras que para los medios CLA, SNA y AA se elaboraron volúmenes de 250 mL. Los medios fueron esterilizados en una autoclave a 121 °C y 15 lb de presión por 20 minutos. Se vaciaron en cajas Petri Klinikus® de 100 x 15 mm y 60 x 15 mm dentro de una campana de flujo laminar y se expusieron a luz UV hasta que solidificaron, se almacenaron en bolsas de plástico y se mantuvieron en un refrigerador a una temperatura de 4 °C hasta su uso.



### **Obtención de aislamientos de *Fusarium* a partir del material vegetativo**

El aislamiento se hizo a partir de las raíces con síntomas colectadas en campo de acuerdo a los protocolos descritos por Trigiano *et al.*, (2004), Agrios (2005), la técnica incluyó lavado y desinfección de los fragmentos de raíces colocando cinco trozos de forma equidistante en una caja Petri con medio de cultivo PDA Bioxon®.

Una vez que se obtuvo el aislamiento y crecimiento del fitopatógeno se tomaron puntas de hifa con ayuda de un bisturí previamente esterilizado y se transfirieron a otra caja Petri con medio de cultivo PDA, de igual manera y se transfirieron a cajas Petri con medio de cultivo SNA para la obtención de conidios.

### **Cultivos monoconidiales y preservación del fitopatógeno**

A las tres semanas de transferidas las puntas de hifa se tomaron discos de medio SNA de 5 mm de diámetro con micelio de tres semanas de crecimiento y se colocaron en tubos de ensaye con 5 mL de agua destilada estéril, los tubos se agitaron para conseguir una suspensión de conidios, se tomaron 25  $\mu$ L con ayuda de la micropipeta y se depositaron al centro de una caja Petri con medio AA. La suspensión se distribuyó con ayuda de un asa bacteriológica previamente esterilizada y se incubaron a 25 °C por 24 h.

Una vez terminado el periodo de incubación, se agregaron 4 mL de glicerol estéril al 25 %, se agitó con ayuda de la micropipeta para desprender los conidios y se recuperó la solución en microtubos estériles de 2 mL que se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

### **Características culturales en medio de cultivo PDA**

Para cada aislamiento se inocularon 20  $\mu$ L de suspensión de conidios en glicerol a 25 % en cajas Petri con medio PDA. Se determinó el tipo y espesor del micelio, el color de la colonia y pigmentación del agar de acuerdo al Mathuen Handbook of Colour (Kornerup y Wanscher, 1963) y la herramienta Color Picker para Mac OS X, así como la presencia de clamidosporas e hifas enrolladas. Se hicieron revisiones a los 15, 30 y 60 días.

### **Características morfológicas en medio de cultivo CLA**

Se inocularon 20  $\mu$ L de suspensión de conidios en glicerol al 25 % en cajas Petri con medio CLA. Las observaciones se hicieron 10 días posteriores a la inoculación del medio. Para determinar el tamaño de los macroconidios y microconidios se midieron 30 conidios (largo y ancho) de cada tipo por aislamiento en un microscopio compuesto. Además se determinó la presencia de clamidosporas e hifas enrolladas (Leslie y Summerell, 2006).

### **Tasa de crecimiento**

Se tomaron discos de micelio de 1 cm de diámetro y se colocaron en 5 cajas Petri con medio PDA, éstas se incubaron a 21 °C y el crecimiento se midió a las 72 horas. La tasa de crecimiento (mm) diario fue obtenida de la diferencia resultante entre el diámetro final, menos el diámetro inicial y dividido entre el total de días evaluados (Leslie y Summerell, 2006).

### **Dendrograma de caracteres culturales y morfológicos**

Los valores morfológicos y culturales se sometieron a un análisis de componentes principales de Pearson en el programa estadístico XLSTAT 6.01, para reducir el número de variables mediante combinaciones perdiendo la menor cantidad de información. Se seleccionaron los componentes que representaron el mayor número de variabilidad acumulada, para posteriormente hacer el análisis de cluster de componentes principales y un análisis de cluster de aglomeración jerárquica para obtener un dendrograma representativo de la distribución de los aislados de acuerdo a sus características morfológicas (Zaccardelli *et al.*, 2008).

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Zonas de muestreo

Las características de las localidades donde se realizaron los 10 muestreos (Figura 1) se describen en el Cuadro 1. Éstos sitios difieren en sus características agroecológicas.

**Cuadro 1:** Localización geográfica de 10 sitios de muestreo en localidades pertenecientes a la franja aguacatera del estado de Michoacán.

Localidad	Altura (msnm)	Localización	
Uruapan	1924	N 19°47'83"	-102°00'77" W
Uruapan	1628	N 19°35'77"	-102°05'32" W
Ario de Rosales	1458	N 19°28'90"	-102°00'32" W
Nuevo Parangaricutiro	1860	N 19°38'05"	-102°14'99" W
Tacámbaro	2008	N 19°24'16"	-101°46'16" W
Los Reyes	1386	N 19°59'26"	-102°44'96" W
Tancítaro	2019	N 19°34'00"	-102°35'44" W
Peribán	1649	N 19°51'90"	-102°40'45" W
Tingambato	1960	N 19°50'13"	-101°84'80" W
Ziracuaretiro	1463	N 19°42'28"	-101°89'79" W



**Figura 1.** Colecta de raíces con síntomas de pudrición: a) Toma de la muestra. b) Raíces de aguacate con síntomas de pudrición.

### Aislamiento y purificación de *Fusarium* spp.

De los aislamientos realizados a partir de raíces con síntomas de pudrición, procedentes de 10 localidades pertenecientes a la franja aguacatera del estado de Michoacán, se obtuvieron un total de 19 aislados del género *Fusarium* (Figura 2; Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Localización geográfica del sitio de colecta de 19 aislados de *Fusarium*.

Muestra	Localidad	Altura (msnm)	Localización	
F1	Uruapan	1628	N 19°35'77"	-102°05'32" W
F2	Uruapan	2019	N 19°34'00"	-102°35'44" W
F3	Nuevo Parangaricutiro	1860	N 19°38'05"	-102°14'99" W
F4	Tancítaro	2019	N 19°34'00"	-102°35'44" W
F5	Peribán	1649	N 19°51'90"	-102°40'45" W
F6	Tingambato	1960	N 19°50'13"	-101°84'80" W
F7	Los Reyes	1386	N 19°59'26"	-102°44'96" W
F8	Ario de Rosales	1458	N 19°28'90"	-102°00'32" W
F9	Ario de Rosales	1458	N 19°28'90"	-102°00'32" W
F10	Tacámbaro	2008	N 19°24'16"	-101°46'16" W
F11	Tacámbaro	2008	N 19°24'16"	-101°46'16" W
F12	Nuevo Parangaricutiro	1860	N 19°38'05"	-102°14'99" W
F13	Uruapan	1628	N 19°35'77"	-102°05'32" W
F14	Peribán	1649	N 19°51'90"	-102°40'45" W
F15	Uruapan	1924	N 19°47'83"	-102°00'77" W
F16	Uruapan	1924	N 19°47'83"	-102°00'77" W
F17	Tingambato	1960	N 19°50'13"	-101°84'80" W
F18	Los Reyes	1386	N 19°59'26"	-102°44'96" W
F19	Ziracuaretiro	1463	N 19°42'28"	-101°89'79" W

### Caracterización cultural

Las 19 cepas de *Fusarium* presentaron variabilidad cultural, en cuanto a la forma y color de la colonia, tipo de crecimiento, textura del micelio y tasa de crecimiento.

### **Forma de la colonia y textura del micelio**

Las 19 cepas obtenidas presentaron un crecimiento radial con micelio abundante y denso, esto coincide con las características reportadas por Leslie y Summerell (2006) y Summerell *et al.* (2003) para este género.

### **Color de la colonia**

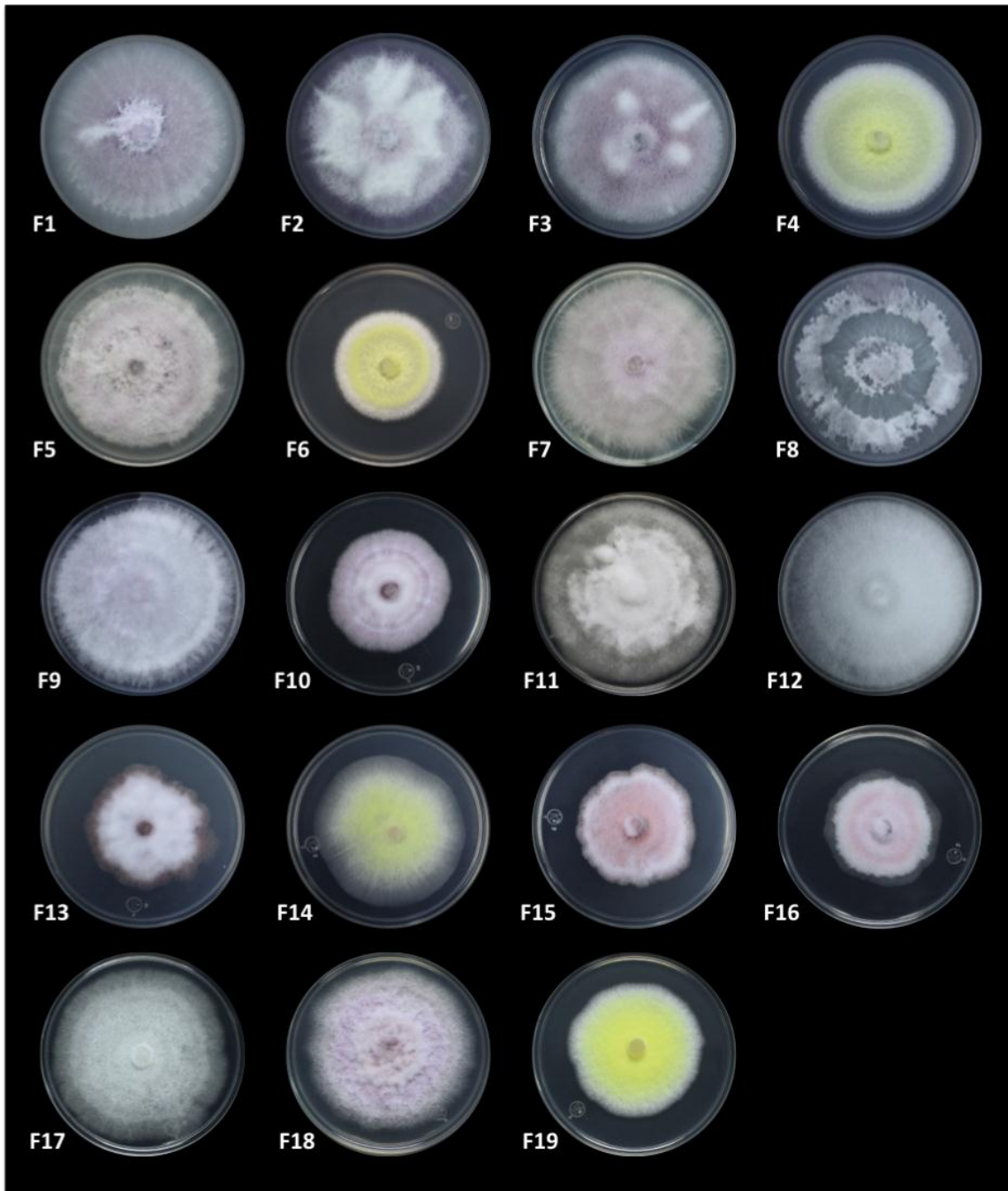
De los aislados, el 30 % presentaron coloración gris, 25 % violeta, 25 % azul y 20 % amarilla (Cuadro 3). Esta variación en la coloración de la colonia es una característica del género *Fusarium*, tal como lo menciona Booth (1975), sin embargo, Leslie y Summerell (2006) indican que los pigmentos no son carácter taxonómico representativo de especies y pueden variar dentro de un mismo aislado, con excepción de un pigmento amarillo característico de *F. thapsinum* (Zaccardelli *et al.*, 2008).

### **Tasa de crecimiento**

La tasa de crecimiento de los aislados osciló entre 1.65 y 5.13 mm/día (Cuadro 3). Esta característica es comúnmente utilizada como un carácter de identificación secundario. Leslie y Summerell (2006) mencionan que esta variable puede ser influenciada por una gran variedad de condiciones como la luz, posición de la caja Petri, cantidad de medio de cultivo, etc., por lo que los resultados de esta prueba no necesariamente son contundentes para la identificación a nivel de especie. Los resultados obtenidos coinciden con lo reportado por Garcés *et al.*, (2001) para *Fusarium oxysporum* Schl., quienes indican que éste puede crecer hasta 1 cm por día a una temperatura de 25 °C, pero en esta investigación difieren con los aislados que presentaron una coloración amarilla, donde las colonias presentaron una tasa de crecimiento mas lenta (2.98-3.17 mm/día), (Leslie y Summerell, 2006).

### **Características morfológicas en medio de cultivo CLA**

Los 19 aislados de *Fusarium* presentaron variabilidad morfológica en cuanto al tamaño, forma y disposición de estructuras como microconidios, macroconidios, clamidosporas e hifas enrolladas.



**Figura 2.** Comparación de 19 aislados de *Fusarium* en medio de cultivo PDA, obtenidos de 10 localidades pertenecientes a la franja aguacatera del estado de Michoacán.

### **Microconidios**

La presencia de microconidios es un carácter considerado importante para la identificación de las especies de *Fusarium*, debido a que no en todas se producen (Leslie y Summerell, 2006). En este caso, todos los aislamientos estudiados los produjeron de manera abundante, siendo de forma ovalada, sin septos y dispuestos

en falsas cabezas (Figura 3), características que coinciden con lo reportado por Leslie y Summerell (2006); Britz *et al.*, (2002) y Ochoa *et al.*, (2012) para las especies *Fusarium oxysporum* y *F. solani*.

*Fusarium oxysporum* produce microconidios de manera abundante con forma oval, elíptica o reniforme, sin septos y en falsas cabezas, mientras que *Fusarium solani* los produce de manera abundante, con forma oval, reniforme, elipsoide y fusiforme, de cero a dos septos y dispuestos en falsas cabezas (Leslie y Summerell, 2006).

### **Macroconidios**

La presencia de macroconidios fue escasa en todos los aislados, éstos se produjeron dispersos y no en estructuras visibles a simple vista que aglutinaran los esporodoquios donde se producen.

Los macroconidios fueron alargados, ligeramente curvados y septados. Se distinguieron dos tipos de esporas, en los aislamientos F4, F6, F14 y F19, que presentaron coloración amarilla en el micelio, tuvieron cinco septos, célula apical redondeada y célula basal en forma de “pie”. El resto de los aislamientos mostraron tres septos, célula apical curvada y célula basal en forma de “pie”. Esto indica la presencia de dos especies pertenecientes a este género. Coincidiendo con lo reportado por Ochoa *et al.*, (2012) y Martínez *et al.*; (2015), quienes reportan macroconidios con misma forma y número de septos, pero ligeramente mas cortos. Los macroconidios son el carácter morfológico mas importante en la identificación de especies de *Fusarium*. En algunos casos la morfología de la espora es suficiente para identificar a nivel de especie. En medio de cultivo CLA suelen ser uniformes y abundantes en especies como *Fusarium oxysporum* y *F. solani*, por lo que se recomienda este medio para su caracterización (Leslie y Summerell, 2006).

### **Clamidosporas**

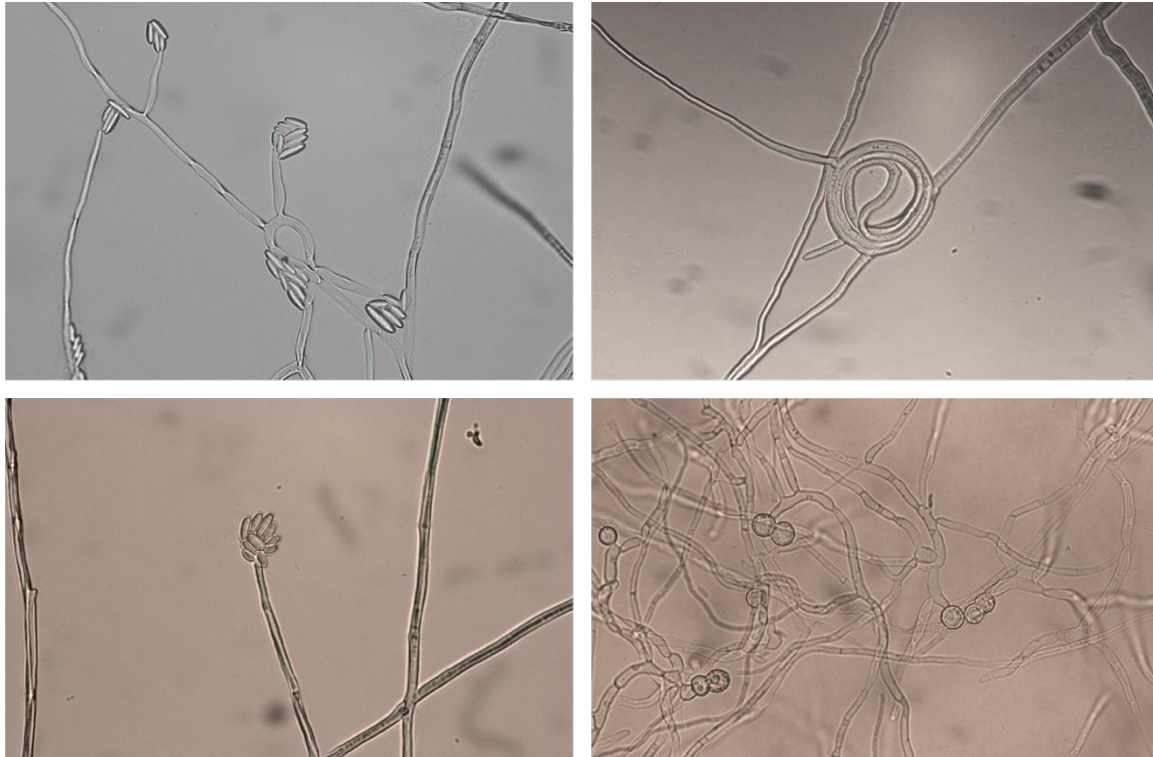
Todos los aislamientos formaron clamidosporas de manera abundante, de forma globosa y pared lisa, éstas tuvieron una disposición terminal e intercalar en las hifas y

se encontraron de manera solitaria y/o en pequeñas cadenas (Figura 3), esto coincide con las características reportadas por Leslie y Summerell (2006); Zaccardelli *et al.*, (2008); Martínez *et al.*, (2015), para *Fusarium oxysporum*. Aunque las clamidosporas presentes en todos los aislados fueron morfológicamente similares, el diámetro de las formadas en los aislados F4, F6, F14 y F19 fue superior al de las del resto de los aislados (Cuadro 3) coincidiendo estas características con lo reportado por Leslie y Summerell (2006); Martínez *et al.*, (2015) para *Fusarium solani* en estos cuatro aislados. Las clamidosporas son caracteres de importancia en la descripción de algunas especies de *Fusarium* (Leslie y Summerell, 2006; Britz *et al.*, 2002). Especies como *Fusarium oxysporum* y *F. solani* presentan clamidosporas abundantes, globosas con pared lisa o ligeramente ornamentada, dispuestas de manera libre o en pequeñas cadenas de hasta tres esporas (Leslie y Summerell, 2006; Zaccardelli *et al.*, 2008). Betancourt *et al.*, (2012) mencionan que en *Fusarium mexicanum* no se forman estas estructuras, por lo que la presencia de este carácter tiene importancia taxonómica a nivel de especie.

### **Hifas enrolladas**

Cuatro de los 19 aislamientos presentaron hifas enrolladas, tanto de manera aérea como inmersas en el medio de cultivo (Figura 3). Este es el carácter de mayor importancia respecto a la caracterización morfológica, las hifas enrolladas son producidas por algunas especies de *Fusarium* causantes de malformación en mango, entre ellas, *Fusarium sterilihyphosum* y *Fusarium mexicanum* (Leslie y Summerell, 2006; Rodríguez, 2012; Britz *et al.*, 2002). Esta característica morfológica también se presenta en *Fusarium circinatum* y *Fusarium pseudocircinatum* (Leslie y Summerell, 2006). Sin embargo, *F. sterilihyphosum* presenta conidios más largos, delgados y clamidosporas ausentes (Leslie y Summerell, 2006), *F. circinatum* y *F. pseudocircinatum* presentan una pigmentación violeta en medio de cultivo PDA y ausencia de clamidosporas (Leslie y Summerell, 2006), estas características difieren de las observadas en los aislados F4 (Peribán), F6 (Tingambato), F14 (Tancítaro) y F19 (Ziracuaretiro), donde se observaron clamidosporas abundantes y una pigmentación amarilla.





**Figura 3.** A) Microconidios, B) Hifas enrolladas, C) Microconidios, D) Clamidosporas.

### **Análisis de datos**

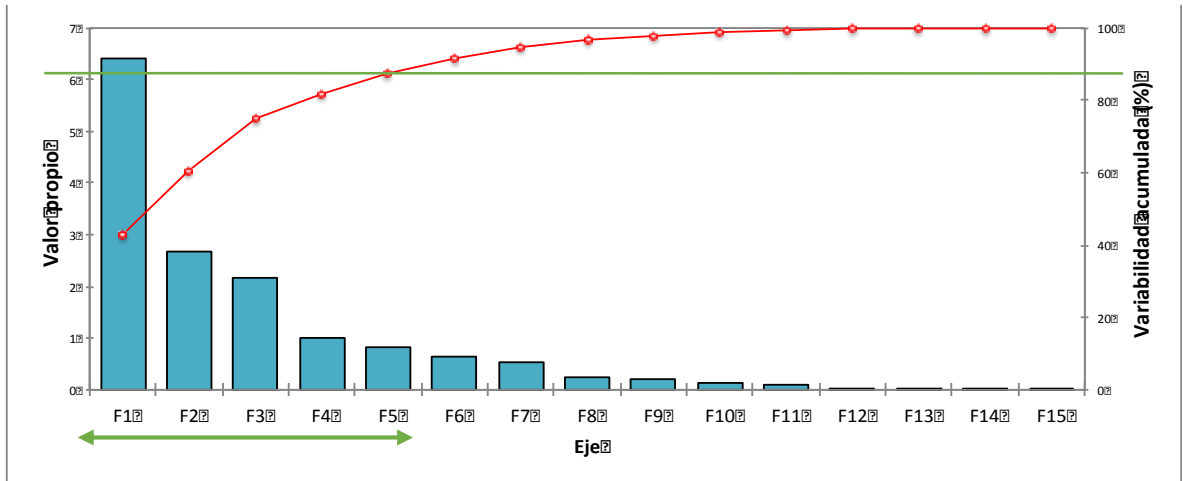
El análisis de componentes principales dio como resultado 15 componentes (Figura 4) de los cuales se seleccionaron los primeros cinco, representantes del 87 % de la variabilidad acumulada para el análisis cluster de aglomeración jerárquica (Figura 6). Posteriormente se obtuvieron las proyecciones de las distancias entre los componentes principales (Figura 5) y la distribución de las cepas de acuerdo a la comparación de los componentes 1 y 2, representantes del 60 % de la variabilidad acumulada (Figura 7), finalmente un análisis biplot correlacionó las proyecciones de los componentes principales y la distribución de las especies en un mismo plano, con esto se logró asociar el agrupamiento que componen y las características que comparten en común (Figura 8), correlacionó los componentes principales y la distribución de los aislados,

El dendrograma distribuyó a los 19 aislados en 4 grupos (Figura 4), el grupo I conformado por los aislados F15 y F16 (Uruapan) y F7 (Los Reyes); grupo II compuesto por F4 (Peribán), F6 (Tingambato), F14 (Tancítaro) y F19 (Ziracuaretiro); grupo III con F10 y F11 (Tacámbaro), F13 (Uruapan) y F18 (Los Reyes) y grupo IV

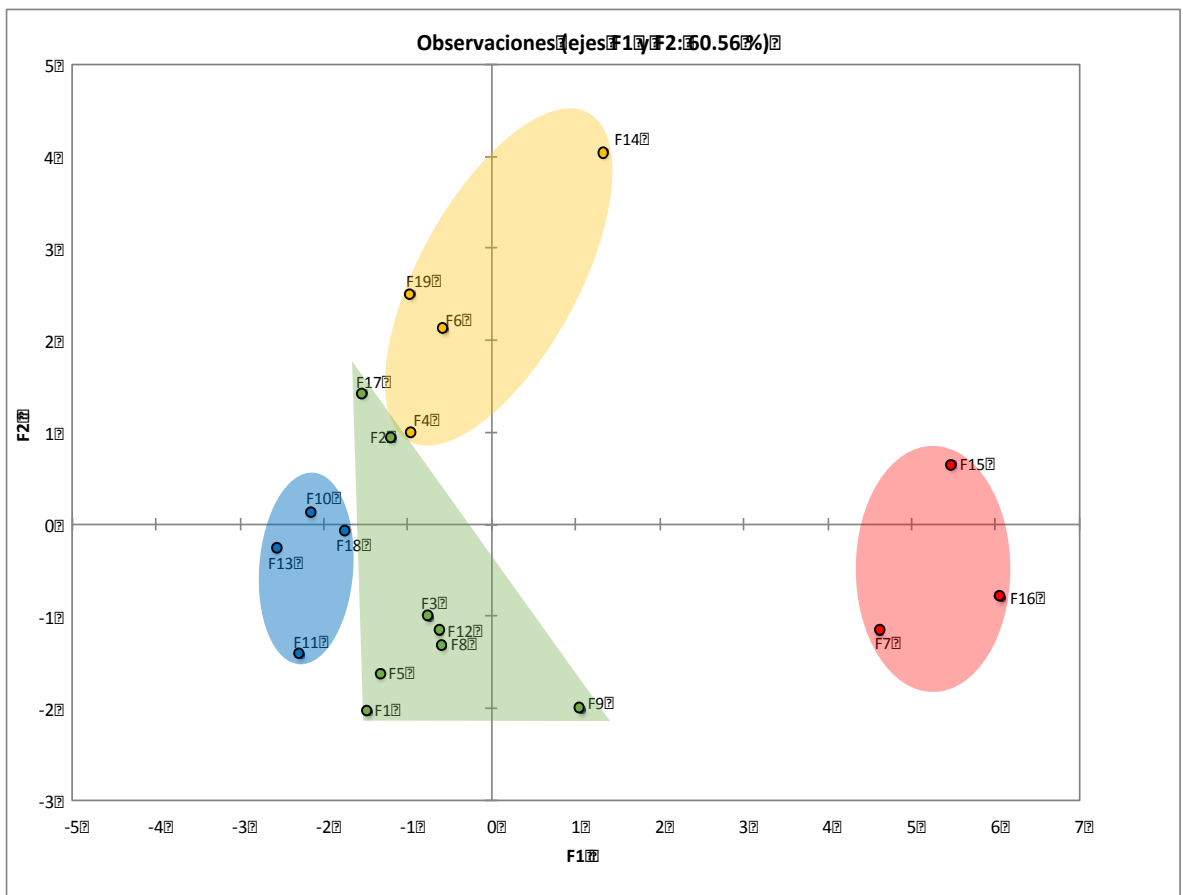
conformado por F1 y F2 (Uruapan), F3 y F12 (Nuevo Parangaricutiro), F5 (Peribán), F8 y F9 (Ario de Rosales) y F17 (Tingambato). Los aislados que forman el grupo I comparten características en común como el color de la colonia, el mayor ancho promedio de los macroconidios y una tasa de crecimiento mas lenta. El grupo II es el mas distinto al resto, comparte características como la presencia de hifas enrolladas, clamidosporas con un mayor diámetro, pigmentación amarilla en el micelio y una tasa de crecimiento lenta. Los miembros del grupo III tiene en común el ancho y largo de microconidios y macroconidios. Finalmente el grupo IV, el mas amplio, tiene en común una alta tasa de crecimiento y pigmentación en tonos azules y grises, esta correlación de componentes principales y la distribución de los aislados es evidente en el análisis biplot (Figura 7).

**Cuadro 3.** Características morfológicas y culturales de 19 cepas de *Fusarium*.

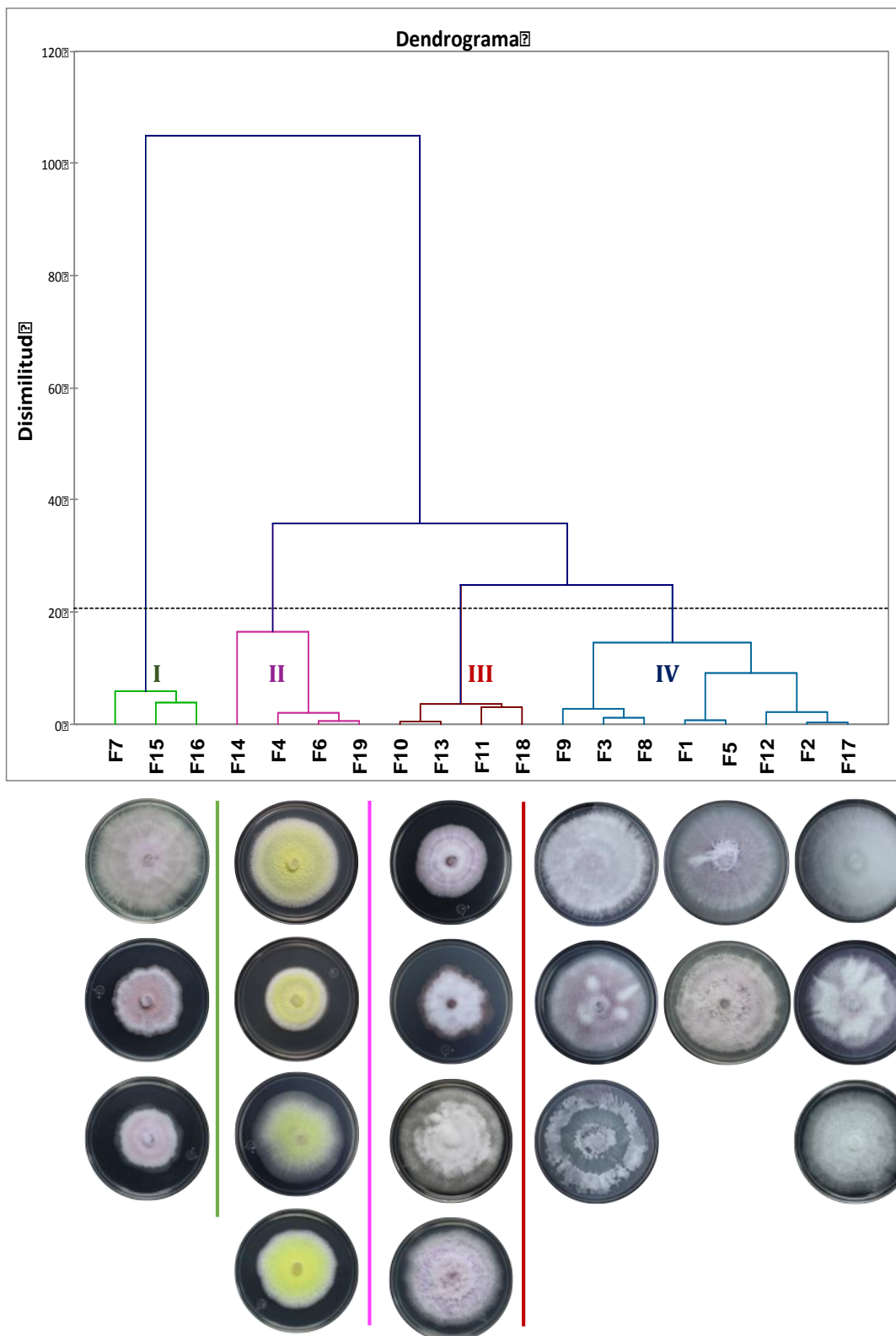
Aislado	Clamidosporas	Microconidios		Macroconidios		Hifas Enrolladas	Tasa de crecimiento	Color de la colonia
	Promedio (um)	Ancho (um)	Largo (um)	Ancho (um)	Largo (um)			
F1	14.18	5.79	13.01	6.72	48.82	Ausente	5.13	Violeta grisáceo
F2	17.60	6.20	14.37	8.50	47.35	Ausente	4.13	Azul negruzco
F3	17.82	5.20	14.55	8.34	45.37	Ausente	4.33	Azul oscuro
F4	19.08	4.40	13.00	9.42	55.23	Presente	3.07	Amarillo pastel
F5	16.27	6.95	15.37	6.74	49.83	Ausente	5.00	Gris azulado
F6	20.43	5.55	15.77	8.98	53.56	Presente	3.10	Amarillo pastel
F7	15.30	5.32	16.42	13.46	36.98	Ausente	2.67	Violeta grisáceo
F8	15.09	5.11	13.97	8.76	49.65	Ausente	5.13	Gris azulado
F9	15.51	4.78	16.00	9.01	44.25	Ausente	4.60	Azul grisáceo
F10	16.18	4.98	13.94	6.64	48.12	Ausente	1.67	Violeta opaco
F11	16.08	4.85	12.89	6.21	49.83	Ausente	3.53	Gris azulado
F12	17.82	5.80	14.02	6.17	40.96	Ausente	4.07	Gris azulado
F13	16.25	4.11	14.63	6.61	48.31	Ausente	2.40	Azul oscuro
F14	19.12	7.71	18.00	9.32	51.12	Presente	3.17	Amarillo verdoso
F15	15.29	6.87	21.15	11.35	36.59	Ausente	2.53	Gris purpúreo
F16	12.56	6.43	17.69	13.63	35.65	Ausente	3.53	Violeta opaco
F17	17.82	6.49	12.43	8.39	37.35	Ausente	3.53	Gris azulado
F18	17.13	5.67	15.37	6.71	48.57	Ausente	3.13	Violeta grisáceo
F19	19.30	5.86	14.57	9.11	56.32	Presente	2.98	Amarillo claro



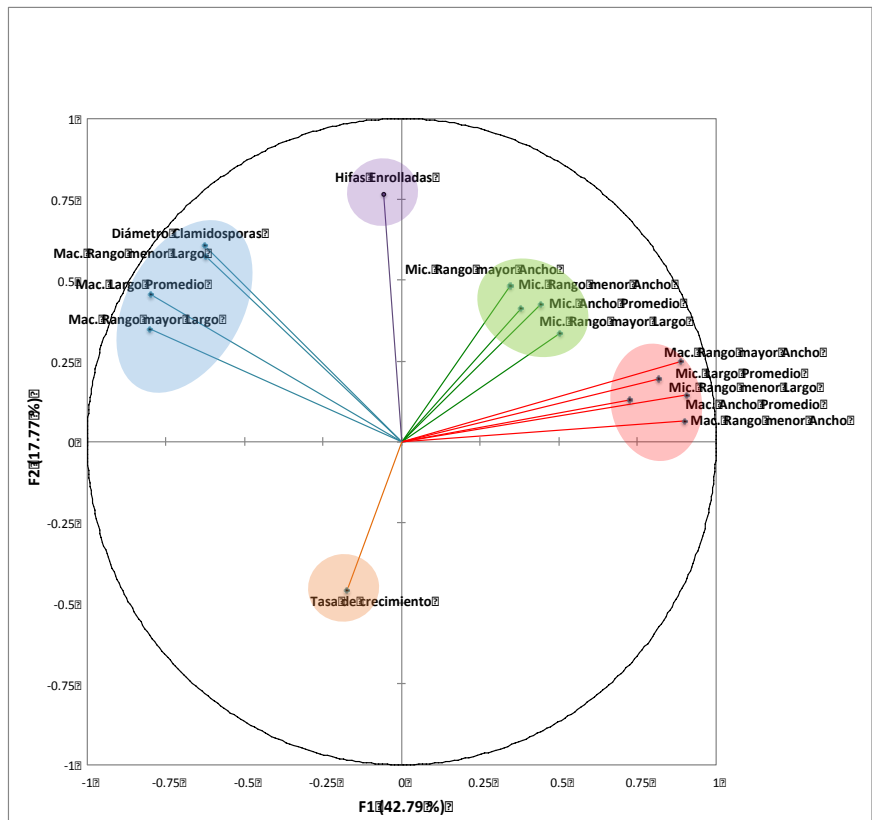
**Figura 4.** Sedimentación de la variabilidad acumulada en los 15 componentes principales obtenidos del análisis de características morfológicas y culturales. Se tomaron en cuenta los primeros 5 componentes principales, representantes del 87 % de la variabilidad.



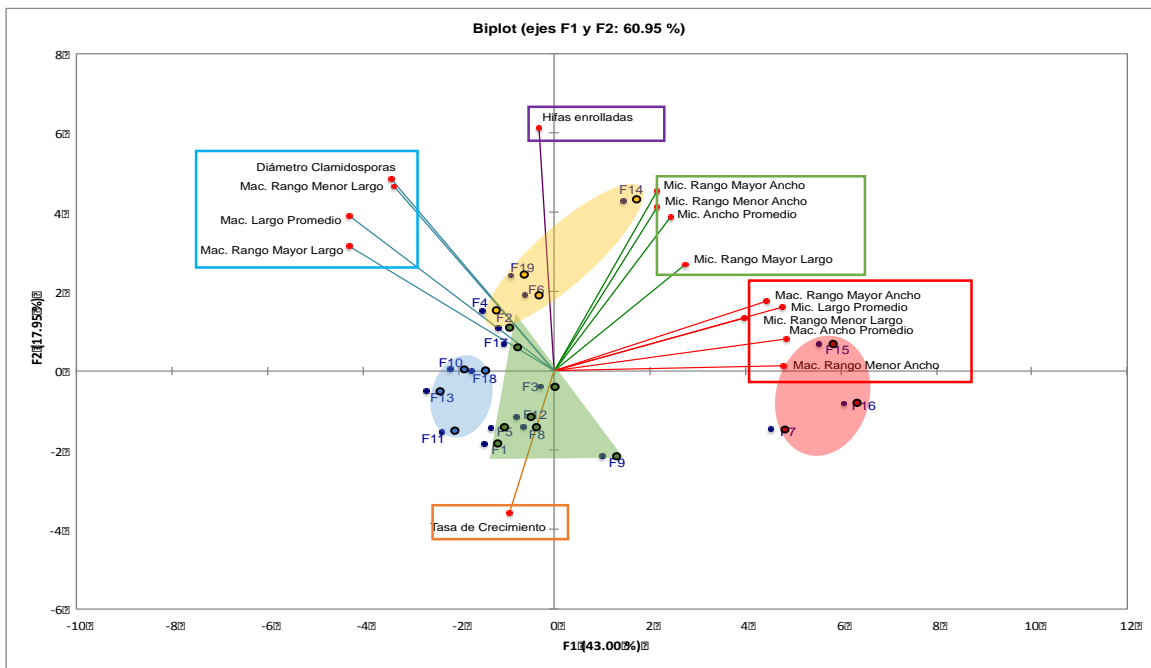
**Figura 5.** Proyección de la distribución de los componentes principales obtenida con base en el análisis de características morfológicas.



**Figura 6.** Dendrograma cluster de distribución jerárquica derivado del análisis de 19 cepas de *Fusarium* con base en 5 componentes principales, representantes del 87 % de la variabilidad acumulada.



**Figura 7.** Proyección de las 19 cepas de *Fusarium* spp. en el plano de los componentes principales 1 y 2 obtenidos del análisis de componentes principales para los caracteres morfológicos y culturales.



**Figura 8.** Análisis biplot representativo de la correlación entre los agrupamientos presentados en el análisis jerárquico de cluster y el análisis de componentes principales.

#### IV. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos se concluye lo siguiente:

Las especies de *Fusarium* aisladas de raíz de aguacate de las diez localidades estudiadas, pertenecientes a la franja aguacatera del estado de Michoacán, presentaron variabilidad morfológica.

Las 19 cepas presentaron un crecimiento radial, micelio abundante y denso con coloraciones violeta, azul, gris y amarillo.

Las cepas F4 de Tancítaro, F6 de Tingambato, F14 de Peribán y F19 de Ziracuaretiro presentaron características morfológicas de *Fusarium solani* Mart.

Las 15 cepas restantes, representantes de todos los municipios con excepción de Ziracuaretiro, se agruparon en tres complejos que presentan características de *Fusarium oxysporum* Schl.

## V. LITERATURA CITADA

- Agrios, N. G. 2005. **Plant Pathology**. Department of Plant Pathology University of Florida. Fifth edition. Elsevier Academic Press. USA. 922 p.
- Betancourt, R. I., Velázquez, M. J. J., Montero, C. J. C., Fernández, P. S. P., Lozoya, S. H., Rodríguez, A. G. 2012. ***Fusarium mexicanum*, Agente Causal de la Malformación de Mango en Jalisco, Mexico**. Revista Mexicana de Fitopatología. (30):115-127.
- Bluhm, B. H., Flaherty, J. E., Cousin, M. A., Woloshuk, C. P., 2002. **Multiplex polymerase chain reaction assay for the differential detection of thichotecene- and fumonisin-producing species of *Fusarium* in cornmeal**. Journal of Food Protection 65, 1955-1961.
- Booth, C. 1986. **The genus *Fusarium***. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Reino Unido. 237 p.
- Britz, H., Steenkamp, E. T., Coutinho T. A, Wingfield, B. D., Marasas, W. F. O., and Wingfield, M. J. 2002. **Two new species of *Fusarium* section *Liseola* associated with mango malformation**. Mycology (94): 722-730.
- Burgess, L. W., Summerell, B. A., Bullock, S., Gott, K. P. and Backhouse, D. 1994. **Laboratory manual for *Fusarium* research**. Department of Crop Sciences, University of Sydney, Sydney.
- Corpoica, 1999. **Estudios biológicos y epidemiológicos de la antracnosis del tomate de árbol y generación de alternativas para su manejo integrado en Colombia**. Santa Fe de Bogotá D. C. 162 p.

- Díaz de Castro, F. J., Restrepo, M. A., Rojas, W., 2007. **Microbiología de las Infecciones Humanas**. Primera Edición. Corporación para Investigaciones Biológicas. Medellín, Colombia.
- Garcés de Granada, E., Orozco de Amezquita, M., Bautista, G. R., Valencia, H. 2001. **Fusarium oxysporum, el hongo que nos falta conocer**. Acta Biol. Colombiana. (6):1-20.
- Gutiérrez, C. M., Lara, C. B. N., Guillén, A. H., Chávez, B. A. T., 2010. **Agroecología de la Franja Aguacatera del Estado de Michoacán, México**. Interciencia. (35): 647-653.
- Kornerup, A., Wanscher, J.H. **Methuen Handbook of Colour**. London, 1963.
- Leslie, J. F. and Summerell, B. A. 2006. **The Fusarium Laboratory Manual**. Blackwell Publishing. Iowa, USA. 387 p.
- Martinez F. E., Martinez, J. P., Guillén, S. D., Peña, C. G., Hernández, H. V. M. 2015. **Diversidad de Fusarium en las raíces de caña de azúcar (*Saccharum o cinarum*) en el estado de Morelos, México**. Revista Mexicana de Micología. (42):33-43.
- Moretti, A., Mulé, G., Susca, A., González, M. T., Logrieco, A. 2004. **Toxin Profile, Fertility and AFLP analysis of Fusarium verticillioides from banana fruits**. European Journal of Plant Pathology. (110):601-609.
- Mullis, K. B. 1993. **The Polymerase Chain Reaction**. Chemistry Nobel Lectures. 103-113.



- Ochoa, F. Y. M., Cerna, C. E., Gallegos, M. G., Landeros, F. J., Delgado, O. J. C., Hernández, C. S., Rodríguez, G. R., Olalde, P. V. 2012. **Identificación de especies de *Fusarium* en semillas de ajo en Aguascalientes, México.** Revista Mexicana de Micología. (36):27-31.
- Ploetz, R. C. 2007. **Diseases of tropical perennial crops: Challenging problems in diverse environments,** Plant Disease, 91:644-663.
- Rodríguez, A. G.; Betancourt, R. I.; Rodríguez, F. R.; Velázquez, M. J. J.; Fernández, P. S. P.; Gómez, D. N. 2012. **Vegetative Compatibility Groups Characterization of *Fusarium mexicanum* Causing Mango Malformation in Jalisco, México.** Revista Mexicana de Fitopatología, 30:128-140.
- SIAP. 2015. **Servicio de Información Agroalimentara y Pesquera.** <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/> (Accesado en enero de 2016).
- Summerell, A. B., Salleh, B. Leslie, F. J. 2003. **A Utilitarian Apporach to *Fusarium* Identification.** Plant Disease. (87):117-128.
- Trigiano, N. R., Windham, T. M., Windham, S. A. 2004. **Plant Pathology, Concepts and Laboratory Excercises.** CRC PRESS. 413 p.
- Windels, C. E., 1992. ***Fusarium*.** In: Singleton, L.L. **Phytopathogenic Fungi.** American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN, pp. 115-128.
- Zaccardelli, L., Vitale, S., Luongo, L., Meright, M., Corazza, L. 2008. **Morphological and Molecular Characterization of *Fusarium solani* isolates.** Journal of Phytopathology. (156):534-541.

Zeller, K. A., Bowden, R. L., Leslie, J. F. 2003. **Diversity of epidemic populations of *Gibberella zeae* from small quadrats in Kansas and North Dakota.** *Phytopathology*. (93):874-880.

## **CAPÍTULO II: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Fusarium* ASOCIADO A RAÍZ DE *Persea americana* Mill. var. *drymifolia* (Schltdl. y Cham.) S.F. Blake**

### **RESUMEN**

En la presente investigación se caracterizaron molecularmente especies del género *Fusarium* asociadas al cultivo del aguacate en el estado de Michoacán. Fueron examinados molecularmente 19 aislados obtenidos de 10 localidades del estado de Michoacán. La extracción de ácidos nucleicos se hizo con base al protocolo descrito por Cenis (1992) y se evaluó la concentración y pureza, posteriormente se amplificaron los fragmentos codificantes para calmodulina y factor de elongación por PCR y se enviaron a Macrogen Inc. en Seúl, Corea del Sur para su secuenciación. Las secuencias se sometieron a un análisis para cuantificar el contenido de guanina y citosina, posteriormente se compararon en homología por medio de un análisis BLAST y se seleccionaron las que presentaron una mayor similitud con los aislamientos en estudio. La totalidad de las secuencias fueron alineadas en MEGA 6.0, se realizó la búsqueda del mejor modelo evolutivo, cálculo de distancias genéticas y construcción de cladogramas con base a neighbor-joining, máxima parsimonia y máxima verosimilitud. El contenido de guanina y citosina fue mayor en los aislados F4 (Tancítaro), F6 (Tingambato), F14 (Peribán) y F19 (Ziracuaretiro) (55-57 %), mientras que el resto de los aislados presentó 47-49 % de éstas. Las distancias genéticas entre los aislados F4, F6, F14 y F19 oscilaron en 1-7 % entre ellas, mientras que en comparación con el resto de los aislados alcanzaron un 51 %. El análisis filogenético de las secuencias que codifican para calmodulina y factor de elongación demostró que los aislados pertenecen a las especies *Fusarium oxysporum* Schl. y *Fusarium solani* Mart.

**Palabras clave:** Calmodulina, Factor de Elongación, *Persea americana*, *Fusarium*.

## SUMMARY

In this research, *Fusarium* species associated with avocado cultivation in the state of Michoacan were molecularly characterized. 19 isolates from 10 localities in the state of Michoacan were examined molecularly. The nucleic acid extraction was based on the protocol described by Cenis (1992), the concentration and purity was assessed, subsequently, fragment coding for the elongation factor calmodulin and were PCR amplified and sent to Macrogen Inc. Seoul, Korea South for sequencing. Sequences were subjected to analysis to quantify the content of guanine and cytosine, then were compared in homology via a BLAST analysis and those which had higher similarity to the isolates were selected. All the sequences were aligned in MEGA 6.0, the search for the best evolutionary model was performed, calculating genetic distances and construction of cladograms based on, maximum parsimony and maximum likelihood. The guanine and cytosine content was higher in the isolated F4 (Tancítaro), F6 (Tingambato), F14 (Peribán) and F19 (Ziracuaretiro) (55-57%), while the remaining isolates showed 47-49% of these. Genetic distances between isolates F4, F6, F14 and F19 oscillated in 1-7 % between them, while compared with the remaining isolates reached 51%. Phylogenetic analysis of the sequences encoding elongation factor calmodulin and showed that isolates belonged to the species *Fusarium oxysporum* Schl. and *Fusarium solani* Mart.

**Keywords:** Calmodulin, Elongation factor, *Persea americana*, *Fusarium*.

## I. INTRODUCCIÓN

Las especies de hongos han sido tradicionalmente identificadas por técnicas morfológicas, sin embargo, la identificación basada en la comparación de caracteres morfológicos a menudo es complicada y lenta, debido a la aplicación de distintas variables a ser evaluadas, así como la observación y reconocimiento de las características de los aislados (Watanabe *et al.*, 2011).

Técnicas de diagnóstico alternativas, como las herramientas moleculares, han sido desarrolladas en las últimas décadas, protocolos basados en PCR e iniciadores específicos proporcionan diagnósticos con un mejor fundamento, así como identificaciones taxonómicas a nivel de especie (Edwards *et al.*, 2002). Las limitaciones asociadas a la variabilidad bioquímica, morfológica y citológica se han desplazado por el desarrollo de marcadores de ADN (Arif *et al.*, 2008).

La ausencia de un código de barras universalmente aceptado para el reino Fungi, el segundo reino eucariótico con más especies, es una limitante para los estudios de biodiversidad multitaxón (Blackwell, 2011). A la fecha, investigadores han desarrollado algunas estrategias para la identificación de aislados de hongos más rápida y fácil, tales como la búsqueda de secuencias de nucleótidos en homología con referencia a las secuencias en una base de datos, la construcción de árboles filogenéticos en base a secuencias y los ensayos basados en PCR con regiones de genes específicos (Watanabe *et al.*, 2011). Marcadores moleculares como, ISSR, AFLP y RAPD han sido ampliamente utilizados para el estudio de la taxonomía de hongos (Dubey y Singh, 2008).

A pesar de que algunos investigadores han estudiado la taxonomía e identificación de especies del género *Fusarium* con base a varios marcadores genéticos, aún no ha sido posible encontrar un marcador adecuado para la identificación de todas las especies de *Fusarium* (Watanabe *et al.*, 2011). El alto grado de variabilidad dentro de *Fusarium oxysporum* ha sido asociado con la complejidad de la especie (Bayeen *et al.*, 2000).

Una gran variedad de marcadores moleculares han sido utilizados para analizar la diversidad de especies de *Fusarium* patógenas de plantas a nivel de genoma: AFLPs en *Fusarium graminearum* y *F. asiaticum* (Qu *et al.*, 2008), RAPD e ISSR en *Fusarium graminearum* y *F. culmorum* (Vogelgsang *et al.*, 2009; Mishra *et al.*, 2004 respectivamente).

Anteriormente se han realizado intentos de caracterizar líneas de *Fusarium oxysporum* por diferentes técnicas, como regiones IGS e ITS, sin embargo éstos no han proporcionado resultados favorecedores (Thangavelu *et al.*, 2011). Los genes del ARN ribosomal han sido utilizados en estudios filogenéticos de hongos. Algunas de las críticas en contra del uso de estos marcadores se basan en que la composición de la base sesgada puede influir en el orden de ramificación del árbol, tasas de evolución entre los linajes desiguales y los sitios invariables, pueden contribuir a la topología de los árboles. Para compensar esto, varios genes codificantes de proteínas han sido explorados como marcadores filogenéticos (Knutsen *et al.*, 2004).

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

Con base en lo anterior, se estableció el siguiente objetivo:

- Caracterizar molecularmente las cepas de *Fusarium* spp. obtenidas a partir de raíces de *Persea americana* Miller, variedad *drymifolia* (Schltdl. y Cham.) S.F. Blake

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

## Colecta y aislamiento de *Fusarium* spp.

Se obtuvieron 19 aislados de *Fusarium* procedentes de 10 muestreos de raíz de aguacate con síntomas de pudrición realizados en localidades pertenecientes a la franja aguacatera del estado de Michoacán (Cuadro 4).

**Cuadro 4:** Sitios de colecta de 19 aislados de *Fusarium* obtenidos localidades pertenecientes a la franja aguacatera del estado de Michoacán.

### Ubicación del área experimental

Muestra	Localidad	Altura (nsmn)	Localización	
F1	Uruapan	1628	N 19°35'77"	-102°05'32" W
F2	Uruapan	2019	N 19°34'00"	-102°35'44" W
F3	Nuevo Parangaricutiro	1860	N 19°38'05"	-102°14'99" W
F4	Tancítaro	2019	N 19°34'00"	-102°35'44" W
F5	Peribán	1649	N 19°51'90"	-102°40'45" W
F6	Tingambato	1960	N 19°50'13"	-101°84'80" W
F7	Los Reyes	1386	N 19°59'26"	-102°44'96" W
F8	Ario de Rosales	1458	N 19°28'90"	-102°00'32" W
F9	Ario de Rosales	1458	N 19°28'90"	-102°00'32" W
F10	Tacámbaro	2008	N 19°24'16"	-101°46'16" W
F11	Tacámbaro	2008	N 19°24'16"	-101°46'16" W
F12	Nuevo Parangaricutiro	1860	N 19°38'05"	-102°14'99" W
F13	Uruapan	1628	N 19°35'77"	-102°05'32" W
F14	Peribán	1649	N 19°51'90"	-102°40'45" W
F15	Uruapan	1924	N 19°47'83"	-102°00'77" W
F16	Uruapan	1924	N 19°47'83"	-102°00'77" W
F17	Tingambato	1960	N 19°50'13"	-101°84'80" W
F18	Los Reyes	1386	N 19°59'26"	-102°44'96" W
F19	Ziracuaretiro	1463	N 19°42'28"	-101°89'79" W

La caracterización molecular se realizó en el laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez" de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en Uruapan, Michoacán.

### **Extracción de ácidos nucleicos**

La extracción de ADN se llevó a cabo por el protocolo de Cenis (1992), el pellet se resuspendió en buffer TE y se almacenó a -20 °C hasta su uso. La calidad se valoró mediante electroforesis en gel y tinción con bromuro de etidio a 120 volts por 20 minutos, se observó en un fotodocumentador ultravioleta MiniBis Pro®.

### **Cuantificación y análisis de calidad del ADN**

La concentración y calidad del ADN se evaluó mediante las lecturas a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro ultravioleta SmartSpec de BioRad® al cual se añadió como aditamento una celda tipo TrayCell de Hellma-Analytics®.

### **Reacción en cadena de la polimerasa**

La reacción se realizó en base a las secuencias que codifican para factor de elongación alfa (ATGGGTAAGGARGACAAGAC) y calmodulina (GAGATATCAAGGAGGCCTTCTC). Para la amplificación se utilizó una mezcla de reacción de PCR para el kit Taq Polymerase Recombinant, Invitrogen, compuesta por 1M Tris pH 9.0 2.5 µL, dNTPs 2 µL, Primer forward 0.5 µL, Primer reverse 0.5 µL, dH<sub>2</sub>O 11.3 µl, 50mM MgCl<sub>2</sub> 3 µL, Taq polimerasa 0.2 µL y 2.5 µL del ADN aislado. La PCR se llevó a cabo en un termociclador Veriti® de Life Technologies® bajo las siguientes condiciones: un ciclo inicial de desnaturalización de 95 °C por 4 minutos; seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por un minuto, alineación a 55 °C por un minuto y extensión a 72 °C por 2 minutos; la extensión final se llevó a cabo a 72 °C durante 10 minutos (Mulé *et al.*, 2004; Knutsen *et al.*, 2004). Las muestras de las amplificaciones se analizaron electroforéticamente en geles de agarosa al 2 % TBEX con un marcador de peso molecular de 100 pares de bases a 120 volts por 5 minutos y posteriormente a 80 volts por 60 minutos, posteriormente los geles se visualizaron en un fotodocumentador ultravioleta MiniBis Pro®.

### **Secuenciación**

El producto de PCR se envió al laboratorio de Macrogen Inc. En Seúl, Corea del Sur, para su purificación y secuenciación.



### **Cálculo de distancias genéticas**

Las secuencias de los aislados y un grupo externo se sometieron a un análisis de distancias en MEGA 6.0, mediante el mejor modelo evolutivo descrito por el software donde se estimó la divergencia evolutiva entre los aislados tomando en cuenta el número de sustituciones de base por sitio entre las secuencias.

### **Contenido de GC**

Se estimó el contenido de guanina y citosina en las 19 secuencias de los aislados y el grupo externo por medio del software DNA/GC Content Calculator.

### **Análisis filogenético**

Las secuencias obtenidas se compararon en homología con las secuencias almacenadas en el GenBank por medio de un análisis BLAST, de donde se obtuvieron las que presentaron el mejor índice de similitud así como aquellas cuyas características morfológicas y antecedentes fueron relevantes para el estudio. Estas secuencias se alinearon y editaron con el software MEGA 6.0, posteriormente se buscó el mejor modelo evolutivo para la construcción de cladogramas en base a los análisis de máxima parsimonia y máxima verosimilitud. Los cladogramas obtenidos fueron editados con la aplicación FigTree 1.4.2 para Mac OSX.

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Cuantificación y calidad de ácidos nucleicos

El ADN extraído de los 19 aislados (Figura 9) tuvo una concentración que osciló entre los 102 y 398 ng/  $\mu$ L, mientras que la relación de absorbancia 260/280 nm fue de 1.79-1.92, esto coincide con lo publicado por Wilfinger *et al* (1997), quienes reportan que una muestra de ADN con valor de  $\sim$ 1.8 es aceptada como “pura”.



**Figura 9:** Visualización de ácidos nucleicos de 19 cepas.

#### Reacción en cadena de la polimerasa

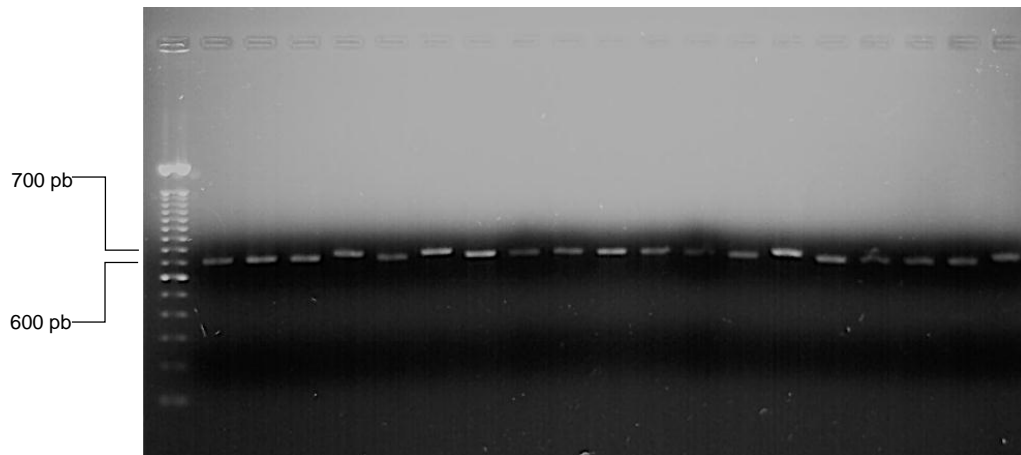
Las PCR basadas en los genes del factor de elongación y calmodulina proporcionaron fragmentos de un tamaño superior a los 600 pares de bases (Figuras 10 y 11 respectivamente). El tamaño de los fragmentos se encuentra entre los reportados para especies del género *Fusarium* (Arif *et al.*, 2015; Knutsen *et al.*, 2004; Mulé *et al.*, 2004; Zaccardelli *et al.*, 2008).

#### Estimación de distancias genéticas

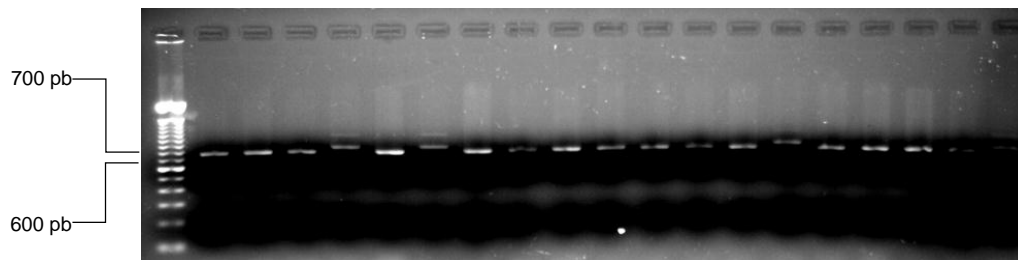
Se realizó el cálculo de distancias genéticas en relación con el número de sustituciones de bases. En el análisis se tomaron en cuenta las 19 secuencias de aislados de *Fusarium* y *F. graminearum* como grupo externo, con un total de 737 caracteres. Se utilizó una tasa de variación entre sitios basada en el modelo Kimura-2 parámetros con distribución en gamma.

Los aislados F4, F6, F14 y F19 presentaron una distancia genética en común que osciló en 1-7 %, por otra parte el resto de los aislados mostraron una distancia en común de 1-20 %, (Cuadro 5) las diferencias genéticas entre ambos grupos alcanzaron

el 55 %, esto sugiere la presencia de dos grupos conformados por dos especies distintas.



**Figura 10:** Amplificación del gen codificante del factor de elongación en gel de agarosa 2%



**Figura 11:** Amplificación del gen codificante para calmodulina en gel de agarosa 2 %.

### **Estimación de porcentajes de GC**

Se calcularon los porcentajes de GC en las secuencias obtenidas de la secuenciación. Las secuencias de los aislados F4, F6, F14 y F19 presentaron una mayor cantidad de GC (51-54 %) respecto al resto de los aislados (46-49 %) (Cuadro 6). Esto indica la formación de dos grupos entre las 19 cepas de *Fusarium* spp.

**Cuadro 5:** Distancias genéticas entre aislados, F1 a F19 representan los 19 aislados de *Fusarium*, XT representa el grupo externo conformado por *Fusarium graminearum*.

	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12	F13	F14	F15	F16	F17	F18	F19	
F1																				
F2	5%																			
F3	4%	1%																		
F4	32%	33%	33%																	
F5	10%	5%	5%	33%																
F6	33%	34%	34%	0%	33%															
F7	4%	2%	2%	34%	4%	34%														
F8	4%	3%	3%	36%	5%	37%	2%													
F9	4%	2%	2%	34%	4%	35%	2%	1%												
F10	4%	2%	2%	35%	4%	36%	2%	1%	1%											
F11	4%	2%	2%	33%	4%	34%	2%	3%	2%	2%										
F12	4%	1%	2%	34%	4%	35%	2%	2%	2%	2%	1%									
F13	14%	12%	11%	50%	14%	51%	11%	10%	9%	9%	11%	11%								
F14	34%	35%	34%	1%	34%	1%	34%	37%	34%	35%	35%	35%	55%							
F15	17%	3%	3%	35%	4%	35%	2%	2%	2%	2%	3%	2%	10%	35%						
F16	16%	20%	2%	34%	4%	35%	1%	1%	1%	1%	2%	2%	11%	34%	1%					
F17	13%	1%	1%	33%	4%	34%	2%	3%	2%	2%	2%	1%	12%	35%	3%	2%				
F18	1%	5%	5%	34%	1%	34%	4%	4%	4%	4%	5%	5%	14%	33%	4%	4%	5%			
F19	39%	40%	40%	6%	39%	6%	40%	43%	40%	42%	40%	41%	52%	7%	42%	41%	40%	40%		
XT	42%	34%	41%	23%	38%	22%	41%	46%	37%	29%	31%	37%	33%	26%	39%	30%	35%	29%	19%	

**Cuadro 6:** Porcentajes de GC en las secuencias de los 19 aislados de *Fusarium* y el grupo externo *F. graminearum*.

Aislado	GC	Aislado	GC	Aislado	GC	Aislado	GC
F1	49%	F6	51%	F11	49%	F16	47%
F2	47%	F7	47%	F12	48%	F17	49%
F3	47%	F8	49%	F13	47%	F18	47%
F4	52%	F9	47%	F14	54%	F19	52%
F5	46%	F10	48%	F15	49%	XT	46%

### Análisis filogenético

Las secuencias seleccionadas del Genbank para factor de elongación y calmodulina, en virtud de su similitud, están representadas en los cuadros 7 y 8 respectivamente.

**Cuadro 7:** Secuencias codificantes para el factor de elongación obtenidas del Genbank.

ACCESION	ESPECIE	ORIGEN
KJ648634	<i>Fusarium oxysporum</i>	MALASIA
KM092365	<i>Fusarium oxysporum</i>	NUEVA ZELANDA
DQ452430	<i>Fusarium oxysporum</i>	COREA DEL SUR
KF225015	<i>Fusarium oxysporum</i>	FRANCIA
JF740853	<i>Fusarium oxysporum</i>	EUA
JF740725	<i>Fusarium oxysporum</i>	EUA
AF160271	<i>Fusarium pseudocircinatum</i>	EUA
KM823607	<i>Fusarium mexicanum</i>	MEXICO
AF160295	<i>Fusarium circinatum</i>	EUA
DQ452858	<i>Fusarium sterilihyphosum</i>	BRASIL
JF740850	<i>Fusarium solani</i>	EUA
DQ247542	<i>Fusarium solani</i>	EUA
JF740784	<i>Fusarium solani</i>	EUA
KF022238	<i>Fusarium graminearum</i>	BRASIL

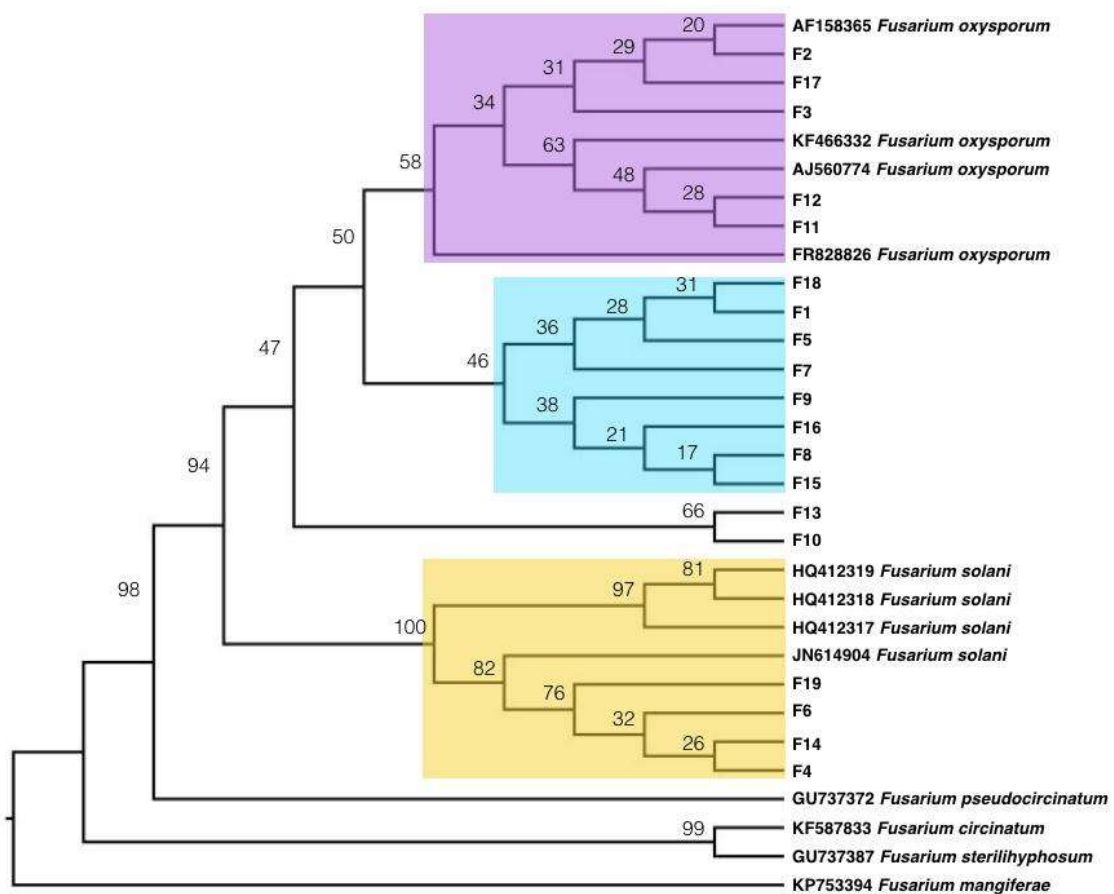
**Cuadro 8:**  
codificantes  
calmodulina obtenidas del Genbank.

Secuencias  
para

ACCESION	ESPECIE	ORIGEN
FR828826	<i>Fusarium oxysporum</i>	ITALIA
KF466332	<i>Fusarium oxysporum</i>	EUA
AJ560774	<i>Fusarium oxysporum</i>	ITALIA
AF158365	<i>Fusarium oxysporum</i>	EUA
GU737372	<i>Fusarium pseudocircinatum</i>	MEXICO
KF597833	<i>Fusarium circinatum</i>	BRASIL
GU737387	<i>Fusarium sterilihyphosum</i>	USA
JN614904	<i>Fusarium solani</i>	ARGENTINA
HQ412317	<i>Fusarium solani</i>	CHINA
HQ412319	<i>Fusarium solani</i>	CHINA
HQ412318	<i>Fusarium solani</i>	CHINA
KP753394	<i>Fusarium mangiferae</i>	EUA

## Calmodulina

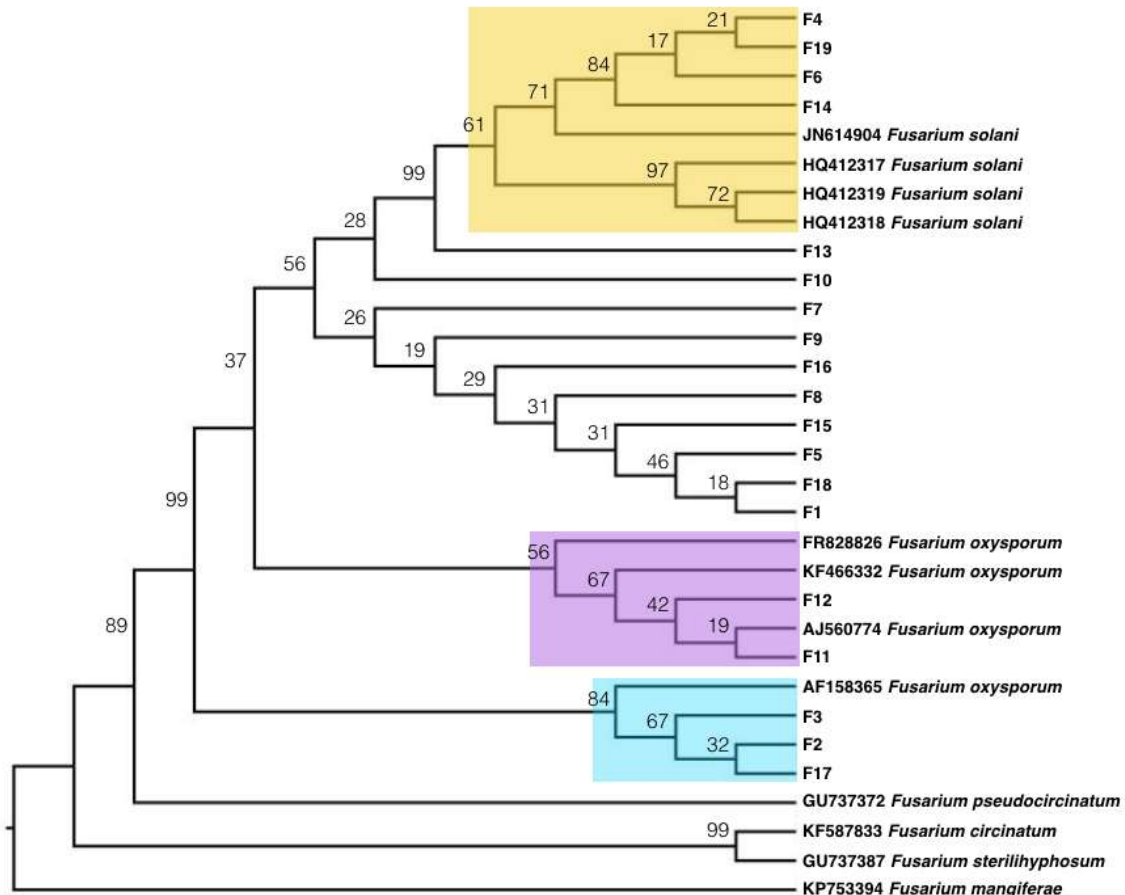
El análisis filogenético de la región codificante para calmodulina se realizó con base a 640 caracteres en un modelo de sustitución GTR, el cladograma obtenido en máxima parsimonia mostró una resolución con cuatro grupos monofiléticos, tres de ellos para distintas líneas de *Fusarium oxysporum* Schl. y uno para *Fusarium solani* Mart. Resalta en el cladograma que las especies tomadas como referencia del Genbank, y que comparten el carácter de hifas enrolladas con los aislados en estudio, no fueron agrupadas dentro de un mismo clado (Figura 12).



**Figura 12:** Cladograma producto del análisis de secuencias de *Fusarium* codificantes de calmodulina en base a máxima parsimonia con 500 repeticiones en bootstrap.

El cladograma para máxima verosimilitud mostró una topología distinta, un grupo monofilético que agrupa los aislados de *Fusarium solani*, dos grupos monofiléticos de *Fusarium oxysporum* y un grupo polifilético hermano de éstos (Figura 13). Los

resultados coinciden con los reportados por O'Donnell *et al.*, (2000), quien demuestra que las secuencias codificantes de calmodulina son eficaces en el análisis filogenético de especies de *Fusarium* altamente relacionadas.



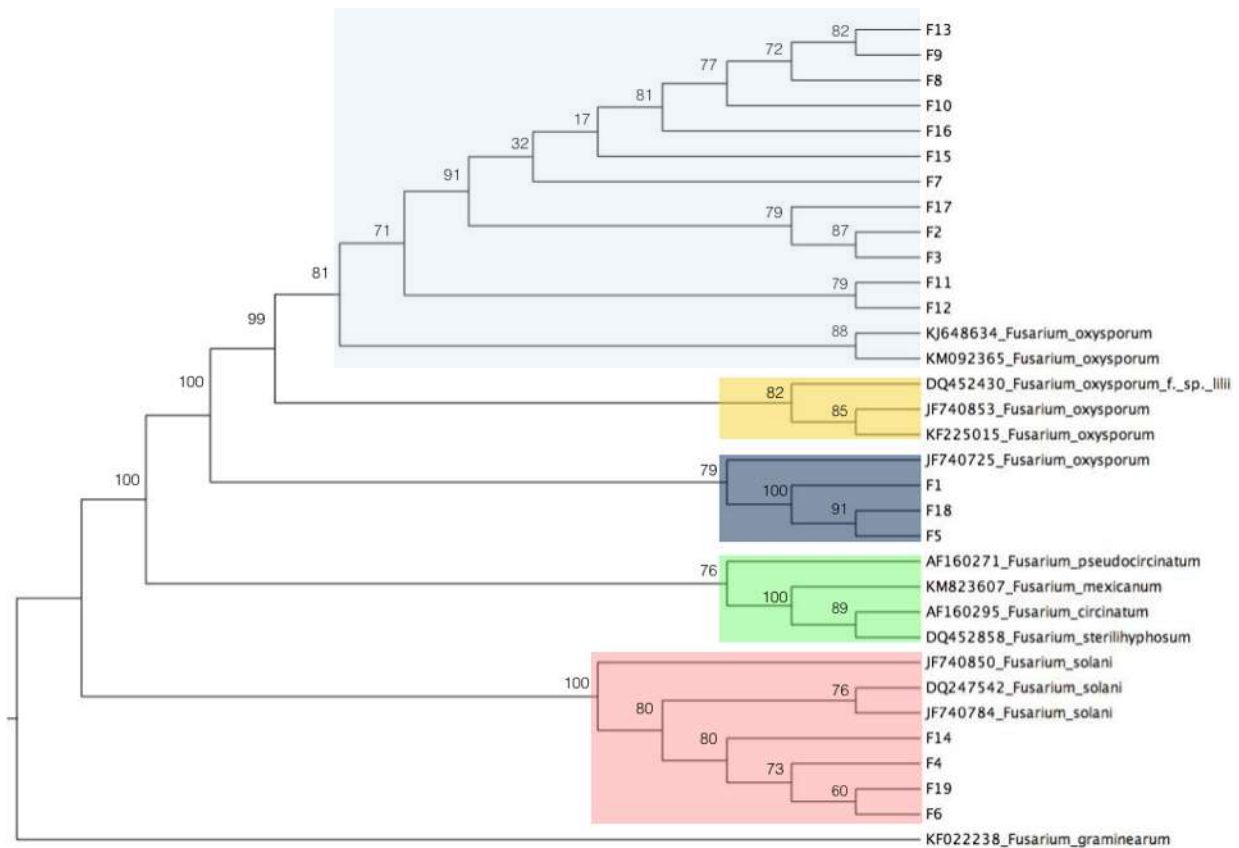
**Figura 13:** Cladograma producto del análisis de secuencias de *Fusarium* codificantes de calmodulina en base a máxima verosimilitud con 500 repeticiones en bootstrap.

### Factor de elongación

El análisis filogenético de la región codificante para factor de elongación se realizó con base a 632 caracteres y un modelo de sustitución GTR+G+I, el cladograma producto del análisis de máxima parsimonia presentó una resolución con cinco grupos monofiléticos, tres para *Fusarium oxysporum*, uno para *Fusarium solani*, y otro más donde se agruparon las especies que comparten el carácter de hifas enrolladas (Figura 14). El cladograma para máxima verosimilitud mostró una topología distinta, su resolución se dio con siete grupos monofiléticos, cinco de ellos para *Fusarium*

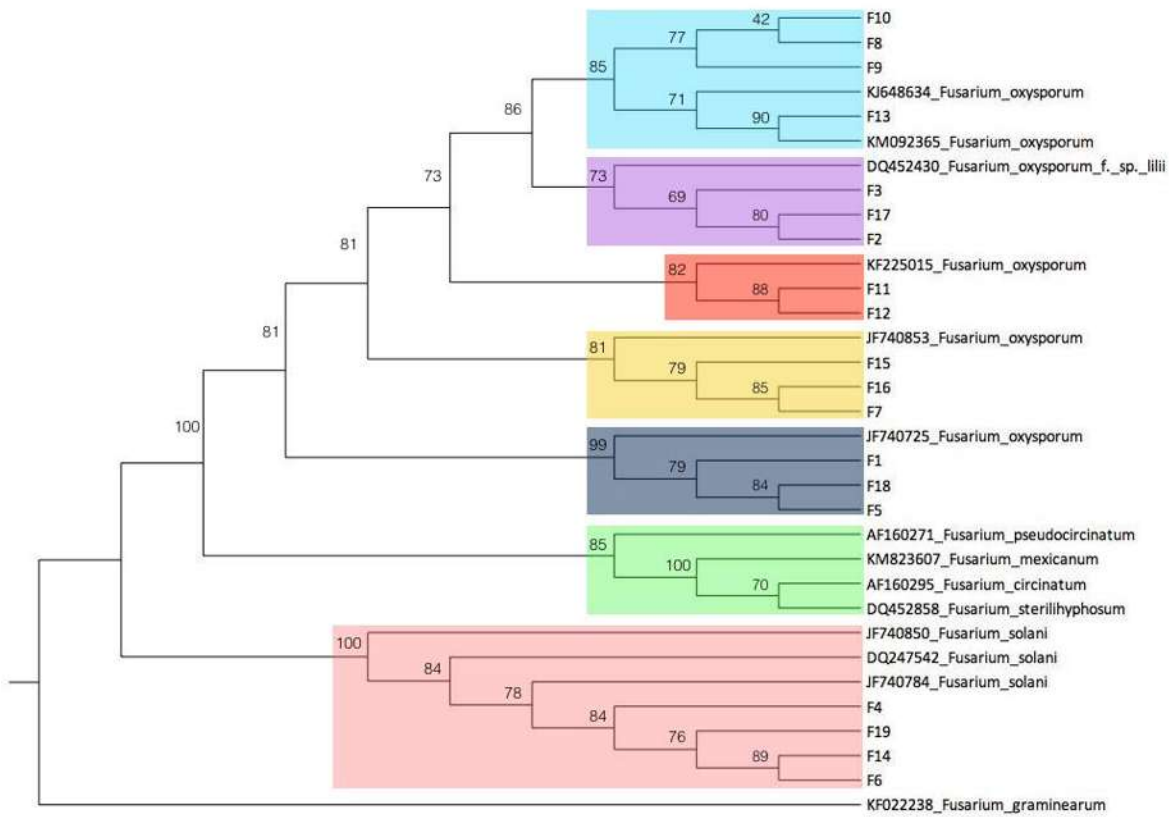
*oxysporum*, uno para *Fusarium solani* y por último un grupo con aquellas especies que comparten el carácter de hifas enrolladas (Figura 15).

Esta resolución coincide con lo establecido por Gupta *et al.*, (2011); Watanabe *et al.*, (2011) y Madania *et al.*, (2013), quienes manifiestan que los análisis filogenéticos realizados con base en marcadores codificantes para proteínas, y en especial la región para el factor de elongación, tienen una resolución superior a otros iniciadores como calmodulina e ITS.



**Figura 14.** Cladograma representativo del análisis de secuencias de *Fusarium* codificantes para factor de elongación realizado en base a máxima parsimonia con 500 repeticiones en bootstrap.





**Figura 15.** Cladograma representativo del análisis de secuencias de *Fusarium* codificantes para Factor de elongación realizado en base a Máxima verosimilitud con 500 repeticiones en bootstrap.

#### IV. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos se concluyó lo siguiente:

Las 19 cepas de *Fusarium* spp. presentaron variabilidad, sus distancias genéticas y concentraciones de GC son congruentes con los agrupamientos observados.

El iniciador que codifica para el factor de elongación presentó una resolución de secuencias superior al codificante para calmodulina.

Asociadas a raíz de *Persea americana* Mill. Var. *drymifolia*, se identificaron las especies *Fusarium oxysporum* Schl. y *Fusarium solani* Mart. por sus características moleculares y filogenéticas.

## V. LITERATURA CITADA

- Arif, M., Zaidi, N. W., Haq, Q. M. R., Singh, Y. P., Taj, G., Kar, C. S., Singh, U. S. 2015. **Morphological and comparative genomic analyses of pathogenic and non-pathogenic *Fusarium solani* isolated from *Dalbergia sisso***. Molecular Biology Reports. Publicado en línea: <http://goo.gl/mUPqED>
- Baayen, R. P., O'Donnell, K., Bonants, P. J. M., Cigelnik, E, K. L., Roebroeck E., Waalwijk, C. 2000. **Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic formae speciales causing wilt and rot disease**. Phytopathology 90:891–900.
- Blackwell, M. 2011. **The Fungi: 1, 2, 3 . . . 5.1 million species?**. American Journal of Botany. 98:426-438.
- Cenis J. L. 1992. **Rapid Extraction of Fungal DNA for PCR Amplification**. Nucleic Acids Research. 20:9.
- Dubey, S. C., Singh, S. R. 2008. **Virulence analysis and oligonucleotide fingerprinting to detect diversity among Indian isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* causing chickpea wilt**. Mycopathologia 165:389-406.
- Edwards, S., O'Callaghan, J., Dobson, A. D. W. 2002. **PCR-Based detection and quantification of mycotoxigenic fungi**. Mycological research 106:1005-1025.
- Feng, L., Ji-guang, W., Ru-Lin, Z., Xiong-chang, O., Jin-mei, C. 2014. **Genetic diversity of *Fusarium mangiferae* isolated from mango malformation disease in China**. Scientia Horticulturae 165:352-356.
- Gupta, V. K., Jain, P. K., Misra, A. K., Gaur, R., Gaur, R. K. 2010. **Comparative Molecular Analysis of *Fusarium solani* Isolates by RFLP and RAPD**.

Microbiology, 79:772-776.

Geiser, M. D., Aoki, T., Bacon, W. C., Baker, E. S., Bhattacharyya, K., Brandt, E., Brown, W., Burgess, W., Chulze, S., Coleman, J., Correll, J., Covert, S., Crous, W. P., Cuomo, A. C., Sybern de Hoog, G., Di-Pietro, A., Elmer, H. W., Epstein, L., Frandsen, J. N., Freeman, S., Gagkaeva, T., Glenn, A., Gordon, T., Gregory F. N., Hammond-Kosack, K., Hanson, E. L., Jimenez-Gasco, M., Kang, S., Kistler, C., Kaldau, G., Leslie, F. J., Logrieco, A., Lu, G., Lysøe, E., Ma, L., McCormick, S., Mmigheli, Q., Moretti, A., Munaut, F., O'Donnell, K., Pfenning, L., Ploetz, C. R., Proctor, H. R., Rehner, A. S., Robert, A. R. G., Rooney, A., Salleh, B., Scandiani, M. M., Scauflaire, J., Short, P. G. D., Steenkamp, E., Suga, H., Summerell, B., Sutton, A. D., Thrane, U., Trail, F., Diepeningen, V. A., VanEtten, D. H., Viljoen, A., Waalwijk, C., Ward, J. T., Wingfield, J. M., Xu, J., Yang, B., Yli-Mattila, T., Zhang, N. 2013. **One Fungus, One Name; Defining the Genus *Fusarium* in a Scientifically Robust Way That Preserves Longstanding Use.** *Phytopathology*, 103:400-408.

Knutsen, A. K., Torp, M., Holst-Jensen, A. 2004. **Phylogenetic analyses of the *Fusarium pose*, *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium langsethiae* species complex based on partial sequences of the translation elongation factor-1 alpha gene.** *International Journal of Food Microbiology*, 95:287-295.

Madania, A., Altawil, M., Naffaa, W., Volker, P., Hawat, M. 2013. **Morphological and molecular characterization of *Fusarium* isolated from Maize in Syria.** *Journal of Phytoathology*, 161:452-458.

Mishra, P. K., Tewari, J. P., Clear, R. M., & Turkington, T. K. 2004. **Molecular genetic variation and geographical structuring in *Fusarium graminearum*.** *Annals of Applied Biology*, 145, 299–307.

Mulé G., Susca, A., Stea, G., Moretti, A. 2004. **Specific detection of the toxigenic species *Fusarium proliferatum* from asparagus plants using primers based**

**on calmodulin gene sequences.** Microbiology Letters, 230:235-240.

- O'Donnell, K., Nirenberg, H. I., Aoiki, T., Cigelnik, E. 2000. **A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: Detection of additionally phylogenetically distinct species.** Mycoscience, 41:61-78
- Palmero, D., Rubio-Moraga, A., Galvez-Patón, L., Nogueras, J., Abato, C., Gómez-Gómez, L., Ahrazem, O. 2014. **Pathogenicity and Genetic Diversity of *Fusarium oxysporum* isolates from corms of *Crocus sativus*.** Industrial Crops and Products, 61:186-192.
- Qu, B., Li, H. P., Zhang, J. B., Xu, Y. B., Huang, T., Wu, A. B. 2008. **Geographic Distribution and Genetic Diversity of *Fusarium graminearum* and *Fusarium asiaticum* on Wheat Spikes Throughout China.** Plant Pathology, 57:15-24.
- Schroers, H. J.; R.P. Baayen; J.P. Meffert; J. de Gruyter; M. Hooftman and K. O'Donnell. 2004. ***Fusarium foetens*, a new species pathogenic to begonia elatior hybrids (*Begonia 3 hiemalis*) and the sister taxon of the *Fusarium oxysporum* species complex.** Mycology, 96:393-406 pp.
- Thangavelu R., Kumar, M. K., Devi, G. P., Mustafa, M. M. 2012. **Genetic Diversity of *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense Isolates (Foc) of India by Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) Analysis.** Molecular Biotechnology, 51:203-211.
- Vogelgsang, S., Sulyok, M., Bänziger, I., Krska, R., Schuhmacher, R., & Forrer, H. R. 2008. **Effect of fungal strain and cereal substrate on in vitro mycotoxin production by *Fusarium poae* and *Fusarium avenaceum*.** Food Additives and Contaminants, 25:745–757.
- Watanabe, M., Yonezawa, T., Lee, K.; Kumagai, S., Sugita-Konishi, Y., Goto, K., Hara-Kudo, Y. 2011. **Evaluation of genetic markers for identifying isolates of the species of the genus *Fusarium*.** Journal of the Science of Food and Agriculture, 91:2500-2504

Wilfinger, W. W., Mackey, K., Chomczynski, P. 1997. **Effect of pH Ionic Strength on the Spectrophotometric Assessment of Nucleic Acid Purity.** *BioTechniques*, 22:474-481.

Zaccardelli, L., Vitale, S., Luongo, L., Merighi, M., Corazza, L. 2008. **Morphological and Molecular Characterization of *Fusarium solani* isolates.** *Journal of Phytopathology*, 156:534-541.

### **CAPÍTULO III: PATOGENICIDAD DE *Fusarium* spp. ASOCIADAS A RAIZ DE *Persea americana* Miller, VARIEDAD *drymifolia* (Schltdl. y Cham.) S.F. Blake**

#### **RESUMEN**

El presente estudio se planteó con el objetivo de evaluar la patogenicidad de especies del género *Fusarium* asociadas al cultivo del aguacate en el estado de Michoacán, mediante la virulencia de las cepas y la severidad de la enfermedad. Se llevaron a cabo 10 muestreos en localidades pertenecientes a la franja aguacatera, se obtuvieron 19 aislados de los cuales 15 fueron identificados como *Fusarium oxysporum* Schlechtendahl (Snyder & Hansen), y cuatro como *Fusarium solani* (Martius) Appel & Wollenweber (Snyder & Hansen). Para evaluar la patogenicidad se obtuvieron plantas de *Persea americana* Mill. var *drymifolia* procedentes de un mismo árbol, éstas se desarrollaron en un sustrato a base de arena estéril. Las plantas de tres meses se inocularon con soluciones de esporas de cada uno de los 19 aislados de *Fusarium* obtenidos. Se evaluó la virulencia con base al tiempo en que aparecieron los primeros síntomas y la severidad de la enfermedad de las cepas por los daños observados en la raíz y ápice comparados con los testigos. Los 19 aislados de *Fusarium* fueron patogénicos para *Persea americana* Mill. var *drymifolia* en las condiciones dadas para este experimento. La virulencia de los aislados osciló entre los 16 y 56 días. El 21 % de los aislados ocasionó amarillamiento de las hojas, el 63 % produjo marchitez del ápice mientras que el 16 % indujo necrosis apical, este fue el síntoma mas severo observado en las plantas.

Palabras clave: Virulencia, Severidad, *F. oxysporum*, *F. solani*, Aguacate.

## SUMMARY

This study is proposed with the aim of evaluating the pathogenicity of *Fusarium* species associated with avocado cultivation in the state of Michoacan, based on the virulence and severity of the disease. 10 surveys were conducted in localities in the avocado strip, 19 isolates were obtained of which 15 were identified as *Fusarium oxysporum* Schlechtendahl (Snyder & Hansen), and four as *Fusarium solani* (Martius) Appel & Wollenweber (Snyder & Hansen). To evaluate the pathogenicity, *Persea americana* Mill. *drymifolia* variety, plants were obtained from the same tree, they were developed in a substrate based on sterile sand. Three months old plants were inoculated with spore solutions each obtained from 19 *Fusarium* isolates. Virulence was evaluated based on the time when the first symptoms appeared and severity of disease from damage observed at the root and apex compared to controls. 19 *Fusarium* isolates were pathogenic for *Persea americana* Mill. *drymifolia* variety under the given conditions for this experiment. The virulence of the isolates ranged between 16 and 56 days. 21% of the isolates caused leaf yellowing, 63% produced wilting of the apex while 16% induced apical necrosis, this was the most severe symptom observed in plants.

**Keywords:** Virulence, Severity, *F. oxysporum*, *F. solani*, Avocado.



## I. INTRODUCCIÓN

Las especies del género *Fusarium* spp., se encuentran entre los fitopatógenos más diversos y están ampliamente distribuidos (Agrios, 2005). *Fusarium* spp., producen una gran variedad de metabolitos secundarios que están asociados a las enfermedades que ocasionan en las plantas, así como el cáncer en humanos. Algunos de estos metabolitos tienen uso comercial para la síntesis de productos químicos y como promotores del crecimiento de las plantas (Geiser, 2013; Booth, 1986).

El 80 % de las plantas tienen al menos una enfermedad asociada al género *Fusarium*. Una revisión reciente a la lista de la American Phytopathological Society (APS) revela que 81 de los 101 cultivos económicamente importantes de la lista tienen, al menos, una enfermedad asociada al género *Fusarium*.

Los tipos de enfermedades producidas son muy variables así como su severidad y puede incluir pudriciones de raíz y corona, cáncer, marchitez, pudrición de frutos, semillas y síntomas en las hojas (Leslie y Summerell, 2006). Las enfermedades vasculares reducen la capacidad de traslocación de agua y nutrimentos en las plantas afectadas hasta en un 95 %, lo que ocasiona marchitez en un inicio y eventualmente su muerte (Agrios, 2005). En begonia, las plantas suelen mostrar una combinación de pudrición de la raíz y traqueomicosis con amarillamiento y marchitez de las nervaduras (Schroers *et al.*, 2004). Algunas especies como *F. graminearum* y *F. verticillioides* tienen pocos hospederos, infectan predominantemente a los cereales. En contraste, *Fusarium oxysporum* tiene un rango de hospederos amplio, infecta a plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, además es un patógeno emergente en humanos inmunocomprometidos y otros mamíferos (Ortoneda *et al.*, 2004).

La penetración de *Fusarium* en la planta a nivel radical, se da a través de aperturas naturales dejadas por los pelos radicales o raíces secundarias al salir de las raíces principales, por heridas ocasionadas por nematodos, insectos o labores culturales. La temperatura óptima para el desarrollo del hongo está entre los 25 y 30 °C, pero se pueden encontrar infecciones en rangos menores y mayores de temperatura. El nivel

de humedad en el suelo es otro factor importante para su desarrollo, cuando se tiene exceso de humedad, los macroconidios, microconidios y clamidosporas germinan y penetran rápidamente a los tejidos (Mejía, 2008). La diseminación del patógeno ocurre a través de la siembra de material vegetal infectado, movimiento de suelo, hojas contaminadas y raíces que crecen alrededor de plantas enfermas, aunque el viento y el agua de escorrentía o riego son los principales diseminadores entre áreas cercanas. El hongo sobrevive en su fase saprofítica en el suelo por tiempo indefinido favorecido por alta humedad y lluvias frecuentes (Agrios, 2005; Ploetz, 2006; Leslie y Summerell, 2006).

Las enfermedades de las plantas ocasionadas por *Fusarium* han representado un gran impacto para la sociedad, la más importante ha sido la devastación de la industria comercial del plátano en 1960 por el “mal de Panamá”, ocasionada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Leslie y Summerell, 2006), esta enfermedad se encuentra dispersa en todas las regiones productoras de plátano en Asia, África, Australia y zonas tropicales de América (Thangavelu *et al.*, 2012).

En mango se ha identificado a *Fusarium mexicanum* (Betancourt *et al.*, 2012), *F. sp.*, *F. mangiferae*, y *F. sterilihyphosum* (Steenkamp *et al.*, 1999, 2000; Britz *et al.*, 2002; Zheng y Ploetz, 2002; Marasas *et al.*, 2006) y *F. oxysporum* (Bhatnagar y Beniwal, 1977; Kumar y Beniwal, 1992; Ochoa *et al.*, 1994; El Khoreiby, 1997 citado por Ploetz, 2003) como agentes causales de malformación floral y vegetativa. Esta es una de las enfermedades más importantes para el cultivo a nivel mundial, los síntomas característicos incluyen en la malformación del tejido vegetativo una pérdida de la dominancia apical, brotes con entrenudos cortos, hojas pequeñas y angostas. Las ramas con este síntoma no producen inflorescencias y si lo hacen son pocas y malformadas, con flores masculinas en su mayoría, las flores hermafroditas que producen son estériles o si se fertilizan, posteriormente son abortadas (Ploetz, 2003). En guayaba, un cultivo de importancia que se encuentra ampliamente distribuido en climas tropical y subtropical, se ha reportado a *Fusarium solani* como agente causal de la marchitez y muerte de árboles (Misra, 2006).

En cítricos, *F. solani* es el hongo predominante en los aislamientos de la rizósfera, diversos estudios lo han identificado y caracterizado como un oportunista y potenciador entre los patógenos asociados a pudrición de raíz (Bender, 1985).

En lisianthus *Eustoma grandiflorum*, se han reportado aislados pertenecientes al complejo de *Fusarium solani* que ocasionan pudrición de raíz, en base a caracterización morfológica y secuenciación del factor de elongación alfa (Tomioka *et al*, 2011).

En aguacate, el escarabajo ambrosial *Euwallacea aff. fornicata* es encontrado como vector de *Fusarium* sp. nov., perteneciente al complejo de *F. solani* (Mendel *et al.*, 2012). El insecto perfora la corteza y crea galerías, dispersa las esporas del hongo en el interior del árbol donde posteriormente germinan. El hongo al crecer afecta el flujo de agua y nutrientes en el árbol, lo que ocasiona la muerte progresiva de tallos y ramas, y en ocasiones de toda la planta (Ploetz y Peña, 2007). Sin embargo, no hay reportes sobre especies de *Fusarium* asociadas a raíz de aguacate y su capacidad para inducir pudrición radical. Con base en lo anterior, se planteó el siguiente objetivo:

- Evaluar la patogenicidad de aislados de *Fusarium* spp. asociados a la raíz de *Persea americana* Miller, variedad *drymifolia* (Schltdl. y Cham.) S.F. Blake

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### Colecta y aislamiento de *Fusarium* spp.

La colecta de raíces con síntomas de pudrición se realizó en huertos de 10 localidades agroecológicamente distintas, pertenecientes a la franja aguacatera del estado de Michoacán (Cuadro 9). Éstas fueron hechas descubriendo parte del sistema radical de la planta. Se seleccionaron raíces que presentaban una coloración rojizo-marrón. Cada una de las muestras fue colocada de manera individual en bolsas de plástico Ziploc® para evitar su deshidratación, etiquetándose de acuerdo al orden de colecta. Posteriormente fueron llevadas al laboratorio de fitopatología de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” para su procesamiento. El aislamiento de *Fusarium* spp. se hizo mediante las técnicas fitopatológicas descritas por Trigiano *et al.*, (2004) y Agrios (2005), la técnica incluye el lavado y desinfestación de fragmentos de raíces. Se colocaron cinco secciones de raíz de forma equidistante en una caja Petri con medio de cultivo PDA Bioxon®, finalmente fueron incubados a 25 °C en oscuridad.

**Cuadro 9.** Localización geográfica de 10 sitios de muestreo en localidades pertenecientes a la franja aguacatera del estado de Michoacán.

Localidad	Altura (msnm)	Localización	
Uruapan	1924	N 19°47'83"	-102°00'77" W
Uruapan	1628	N 19°35'77"	-102°05'32" W
Ario de Rosales	1458	N 19°28'90"	-102°00'32" W
Nuevo Parangaricutiro	1860	N 19°38'05"	-102°14'99" W
Tacámbaro	2008	N 19°24'16"	-101°46'16" W
Los Reyes	1386	N 19°59'26"	-102°44'96" W
Tancítaro	2019	N 19°34'00"	-102°35'44" W
Peribán	1649	N 19°51'90"	-102°40'45" W
Tingambato	1960	N 19°50'13"	-101°84'80" W
Ziracuaretiro	1463	N 19°42'28"	-101°89'79" W

### **Purificación de los aislados**

De las cepas puras de *Fusarium* spp. se obtuvieron cultivos monoconidiales mediante el protocolo descrito por Leslie y Summerell (2006) los cuales se preservaron a -70 °C. De esta solución de esporas se tomaron 20 uL que se depositaron en medio de cultivo PDA y almacenaron a 25 °C en oscuridad por dos semanas hasta su uso.

### **Identificación de *Fusarium* spp.**

Para la identificación de los aislados de *Fusarium* spp se utilizaron las claves descriptivas de Leslie y Summerell (2006). Se determinó el tipo de crecimiento, forma y color de las colonias, así como características de las estructuras reproductivas.

### **Preparación del sustrato**

En contenedores de plástico limpios y desinfectados con cloro se depositó arena previamente esterilizada durante una hora a 121 °C como sustrato para garantizar la inocuidad y evitar la incorporación de patógenos que se pudieran encontrar en materia orgánica.

### **Obtención del material vegetativo**

Se recolectaron frutos maduros de un árbol de aguacate criollo de la raza mexicana *Persea americana* Mill. var *drymifolia* con buenas características en cuanto a porte, vigor y tamaño de la fruta, así como de la sanidad de la misma. Los frutos fueron recolectados directamente del árbol, para evitar que estuvieran en contacto con el suelo. Al fruto se le retiró con sumo cuidado el epicarpio, mesocarpio y cubierta del embrión (Suppo, 1992). Una vez limpia la semilla se seleccionaron aquellas con características deseables. Éstas fueron sumergidas en agua a 50 °C durante 30 minutos, para eliminar posibles infecciones de microorganismos sin menoscabo de su viabilidad (Ohr *et al.*, 1991). Finalmente fueron sumergidas en agua estéril fría para disminuir su temperatura y se sembraron inmediatamente en el sustrato.

### **Preparación del inóculo**

Para la inoculación de las plantas se utilizó el contenido de dos cajas Petri con 15 días de crecimiento en un litro de agua destilada estéril, éstas se mezclaron con ayuda de un rotor mecánico para homogeneizar la solución. Se midió la concentración de conidios con ayuda de un hematocitómetro.

### **Inoculación**

Las plantas fueron inoculadas con los fitopatógenos a los cuatro meses de edad, mediante el protocolo descrito por Ullstrup (1970), para lo cual se agregaron  $100 \text{ mL}^{-1}$  de una solución de conidios del fitopatógeno cerca de la raíz de la planta, sin ocasionarle ningún daño. Se inocularon cinco plantas por tratamiento que incluían un testigo sin inóculo. Posteriormente se evaluó la severidad y virulencia de cada uno de los tratamientos.

### **Variabes respuesta**

Para determinar la virulencia de los aislados se tomaron en cuenta los días que transcurrieron desde la inoculación hasta la aparición del primer síntoma en la planta. Para determinar la severidad de la enfermedad se tomó en cuenta la escala descrita por Lara (2008) con cuatro grados, las cuales representaban (a) planta sana, (b) amarillamiento, (c) marchitez apical y (d) necrosis apical.

### **Análisis de la información**

El diseño experimental utilizado fue completamente al azar para los datos de virulencia de los aislados de *Fusarium* spp. Los datos correspondientes a esta variable se sometieron a un análisis de varianza y comparación de medias de Tukey  $\alpha=0.05$ . La severidad de la enfermedad, se determinó con base a la escala descrita por Lara (2008).

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Identificación de *Fusarium* spp.

En los 10 muestreos realizados en la franja aguacatera del estado de Michoacán se obtuvieron 19 aislados de *Fusarium* spp. los cuales se identificaron taxonómicamente, por su variación cultural y morfológica. Presentaron micelio abundante y denso, pigmentación gris, azul, violeta y amarillo, microconidios ovalados, sin septos y dispuestos en falsas cabezas, macroconidios con 3 y 5 septos, de forma alargada casi rectos y ligeramente curvados en los extremos, clamidosporas globosas y lisas, dispuestas de manera intercalar y terminal en las hifas, así como la presencia de hifas enrolladas solo en cuatro de los 19 aislamientos. Características que coinciden con las reportadas para *Fusarium oxysporum* Schlechtendahl (Snyder & Hansen), en 15 aislamientos y *Fusarium solani* (Martius) Appel & Wollenweber (Snyder & Hansen) para los cuatro restantes, (Leslie y Summerell, 2006; Summerell *et al.*, 2003; Zaccardelli *et al.*, 2008; Britz *et al.*, 2002; Rodriguez, 2012; Steenkamp *et al.*, 2000).

#### Pruebas de patogenicidad

Las soluciones de inóculo presentaron variabilidad en la concentración de conidios de acuerdo al aislado (Cuadro 10), donde las cepas identificadas como *Fusarium solani* presentaron una concentración mas alta, comparadas con los aislados identificados como *Fusarium oxysporum*, que tuvieron concentraciones mas bajas.

#### Virulencia de los aislado

El análisis de varianza practicado a los datos obtenidos detectó diferencias altamente significativas ( $P > 0.0001$ ) para esta variable. Los resultados de la prueba de comparación de medias de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ) se muestran en el Cuadro 11. El tiempo transcurrido para que se presentaran los primeros síntomas fue distinto y dependió de la especie. En el caso de *Fusarium solani* fluctuó entre 51-56 días (Cuadro 10), mientras que para *Fusarium oxysporum* se tuvo un rango de 16 a 46 días.

**Cuadro 10.** Concentración de conidios, virulencia y severidad de la enfermedad de 19 cepas de *Fusarium sp.*

Tratamiento	Concentración (Conidios/mL)	Virulencia (Días)	Severidad de la Enfermedad
F1	670,000	31	Marchitez apical
F2	950,000	36	Marchitez apical
F3	580,000	39	Marchitez apical
F4	1,090,000	53	Marchitez apical
F5	450,000	38	Amarillamiento
F6	1,140,000	51	Amarillamiento
F7	380,000	16	Necrosis apical
F8	430,000	29	Marchitez apical
F9	260,000	32	Marchitez apical
F10	330,000	39	Marchitez apical
F11	350,000	32	Marchitez apical
F12	560,000	22	Necrosis apical
F13	380,000	17	Necrosis apical
F14	1,200,000	56	Marchitez apical
F15	390,000	32	Amarillamiento
F16	310,000	38	Marchitez apical
F17	380,000	43	Marchitez apical
F18	410,000	36	Marchitez apical
F19	1,240,000	54	Amarillamiento
Testigo	0	-	Planta sana

Los síntomas observados fueron amarillamiento, marchitez y necrosis apical. La cepa con mayor virulencia fue F7, que pertenece al municipio de Los Reyes, y corresponde a *Fusarium oxysporum*. Esto coincide con los resultados reportados por Koyyappurath *et al.* (2015), donde *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-vanillie* ocasionó amarillamiento y defoliación a los 15 días posteriores a la inoculación.



Por otra parte, Costa *et al.*, (2015), manifiesta que *Fusarium solani* ocasionó pudrición radicular a los 35 días, esto difiere con lo reportado por Gaetán *et al.* (2007) quien reporta a *Fusarium solani* ocasionando pudrición de raíz y corona dos semanas después de la inoculación.

**Cuadro 11.** Comparación de medias (Tukey  $\alpha=0.05$  %) para virulencia de 20 tratamientos correspondientes a 19 cepas de *Fusarium* y un testigo.

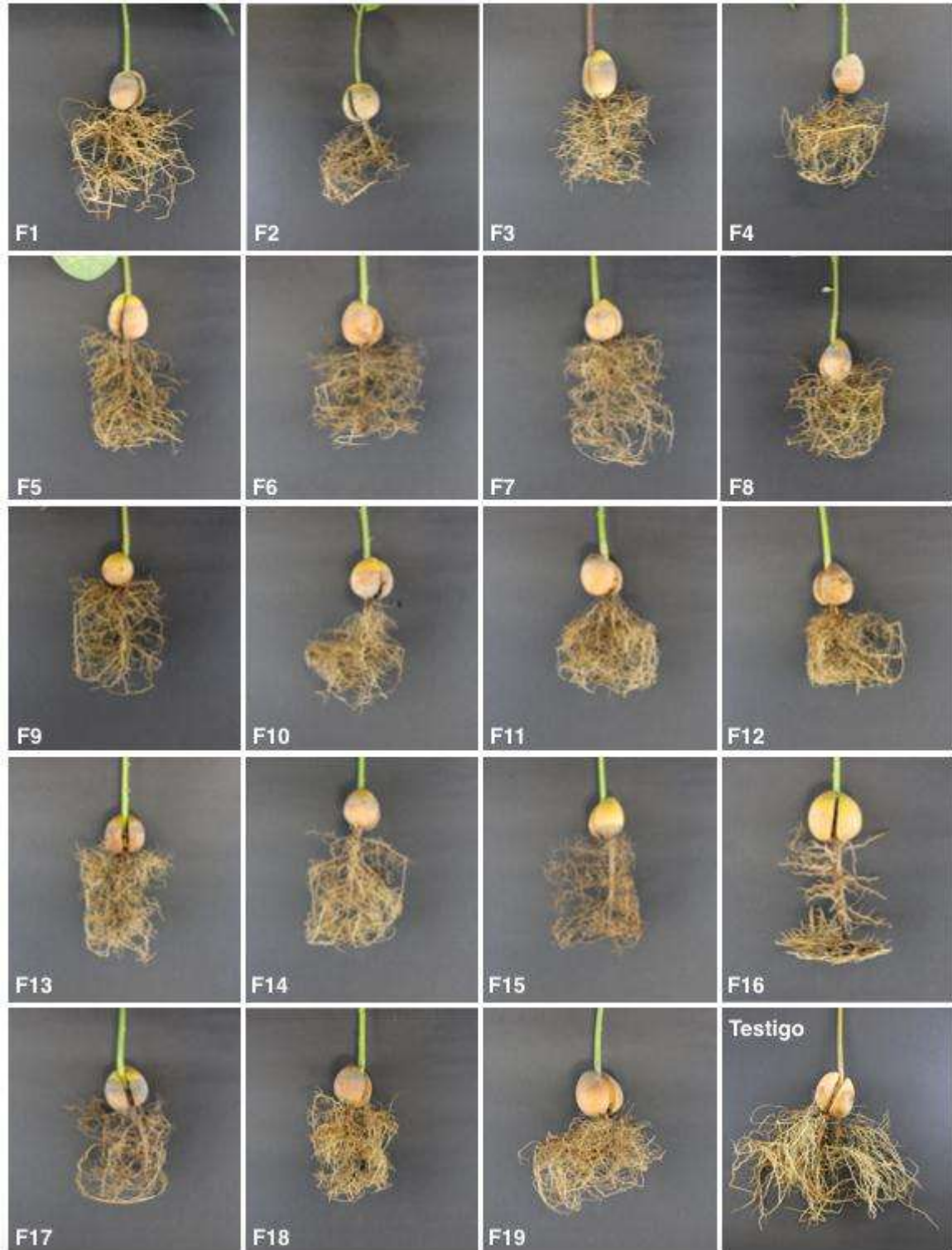
CEPA	LOCALIDAD	MEDIA	GRUPO
F14	Peribán	56.2	A
F19	Ziracuaretiro	54.0	A B
F4	Tancítaro	53.4	A B
F6	Tingambato	51.0	B
F17	Tingambato	43.4	C
F3	N. Parangaricutiro	39.0	D
F10	Tacámbaro	38.0	D
F5	Peribán	38.2	D E
F16	Uruapan	37.6	D E
F18	Los Reyes	36.4	E E
F2	Uruapan	36.2	D E
F11	Tacámbaro	34.6	E F
F15	Uruapan	32.2	F G
F9	Ario de Rosales	31.8	F G
F1	Uruapan	31.4	F G
F8	Ario de Rosales	29.2	G
F12	N. Parangaricutiro	21.8	H
F13	Uruapan	16.6	I
F7	Los Reyes	15.8	I
TESTIGO	-	0	J

### **Evaluación de la severidad de la enfermedad**

La severidad de la enfermedad determinada en plántulas de aguacate inoculadas con los 19 aislados de *Fusarium* indicó variabilidad y se vio reflejada en la reducción del porte de las plantas. A nivel radical, las 19 cepas presentaron una reducción de volumen respecto al testigo, así como una coloración marrón-rojizo en su tejido que indica necrosis (Figura 16).

Éstos síntomas coinciden con los reportados en vainilla por Koyyappurath *et al.* (2015) y en espárrago (Elmer *et al.*, 1996; Elmer, 2105), donde *Fusarium oxysporum* ocasionó pudrición de raíces para el primer caso y pudrición de raíz y corona en plantas maduras, plántulas y trasplantes jóvenes para el segundo. Costa *et al.* (2016) reporta síntomas similares ocasionados por *Fusarium paranaense* sp. nov., perteneciente al complejo de especies de *Fusarium solani*, en la pudrición radical de soya. Aunque para Dandurand y Menge (1992) el rol de *Fusarium solani* en la pudrición de raíz de cítricos es secundario, al no ocasionar la muerte de la planta a pesar de colonizar gran parte de la raíz, la reducción en el porte y fortaleza de la planta si se ven comprometidos, tal como se observó en este experimento.

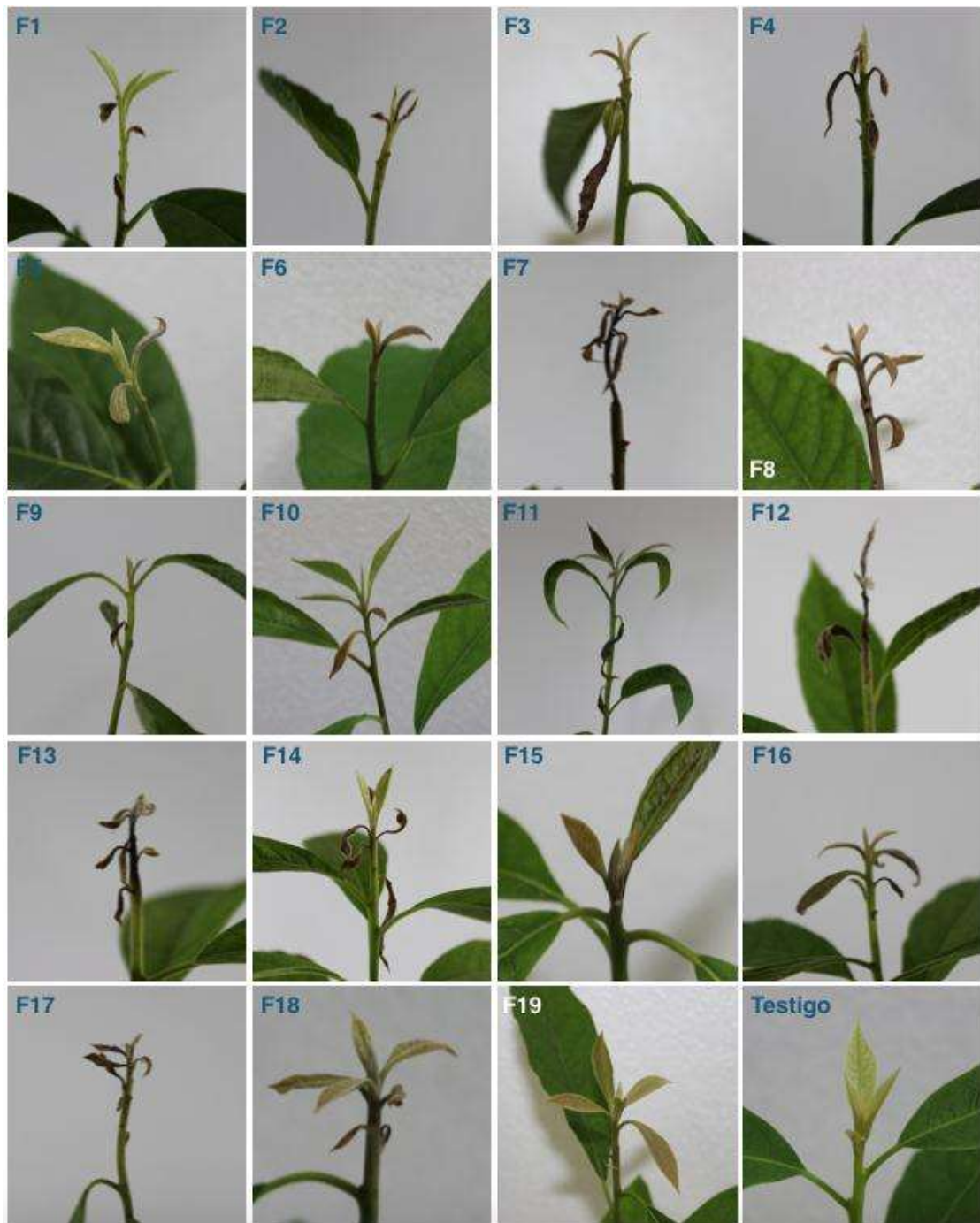
En la parte aérea de la planta, los aislados de *Fusarium* produjeron variabilidad de síntomas. Así, en cuatro de ellas se observó amarillamiento, en 12 marchitez apical y en tres muerte apical (Figuras 17 y 18), al ser comparadas con la planta testigo que se mantuvo sana. Éstos síntomas coinciden con los reportados por Koyyappurath *et al.* (2015) y Gaetán *et al.* (2007), quienes observaron que *Fusarium oxysporum* ocasionó decaimiento general, clorosis y necrosis en los tallos. Por otra parte, Tomioka *et al.* (2011) reportan que *Fusarium solani* en lisianthus (*Eustoma grandiflorum*), produjo además de marchitez, defoliación y posterior muerte de la planta. Figueroa-Rivera *et al.*, (2010) mencionan que de un conjunto de especies de *Fusarium* aisladas de maíz, *Fusarium subglutinans* y *F. verticillioides*, fueron las mas patogénicas y produjeron síntomas similares a los observados en este estudio de manera inicial.



**Figura 16.** Síntomas observados en raíz de aguacate *Persea americana* Mill. variedad *drymifolia* ocasionados por las cepas de *Fusarium oxysporum* y *F. solani*.



**Figura 17.** Síntomas observados en planta de aguacate *Persea americana* Mill. var *drymifolia* ocasionados por las cepas de *Fusarium oxysporum* y *F. solani*.

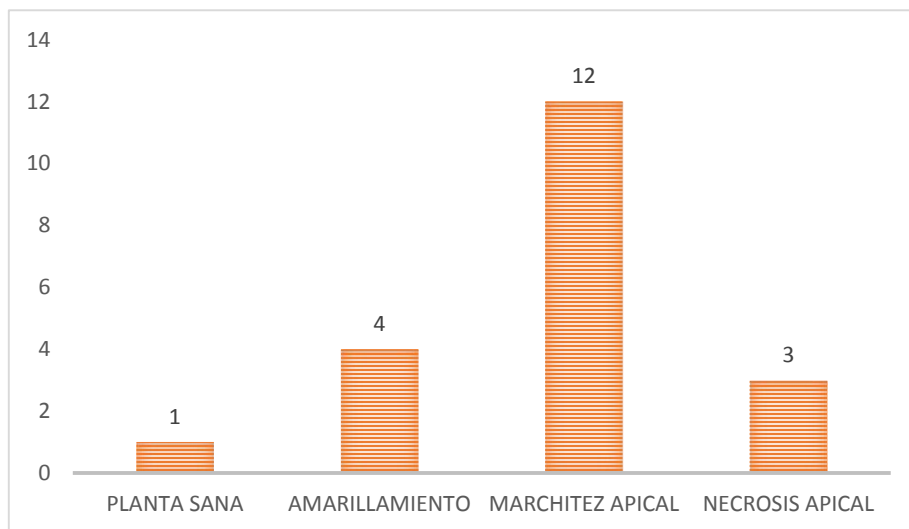


**Figura 18.** Síntomas observados en el brote apical de plantas de aguacate *Persea americana* Mill. var *drymifolia* ocasionados por las cepas de *Fusarium oxysporum* y *F. solani*.

Con los síntomas observados en las plantas de aguacate inoculadas con las especies de *Fusarium oxysporum* y *F. solani* se hizo una escala visual para la cual se establecieron 4 variables: a) Planta sana, b) Amarillamiento, c) Marchitez apical y d) Necrosis apical, siendo este último, el síntoma mas severo que presentaron las plantas.



**Figura 19.** Escala visual para determinar la severidad de la enfermedad. A) Planta sana, B) Amarillamiento, C) Marchitez, D) Necrosis apical.



**Figura 20.** Histograma de frecuencias para evaluación de la severidad de la enfermedad de los 19 aislados de *Fusarium* y un testigo

#### IV. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en la caracterización patogénica de 19 aislados de *Fusarium* se concluyó lo siguiente:

- Las 19 cepas de *Fusarium* resultaron ser patogénicos para *Persea americana* Miller var. *drymifolia*.
- La virulencia de las 19 cepas de *Fusarium* spp., mostró gran variación.
- Las cepas de *Fusarium oxysporum* Schlechtendahl (Snyder & Hansen), presentaron la mayor virulencia, ésta osciló entre 16 a 46 días.
- *Fusarium solani* (Martius) Appel & Wollenweber (Snyder & Hansen), presentó la menor virulencia, fluctuaron entre 51 y 56 días.
- Los síntomas ocasionados por *Fusarium oxysporum* Schl. Y *Fusarium solani* Mart. fueron pudrición radical, amarillamiento foliar, marchitez y necrosis apical.

## V. LITERATURA CITADA

- Agrios, N. G. 2005. **Plant Pathology**. Department of Plant Pathology University of Florida. Fifth edition. Elsevier Academic Press. USA. 922 p.
- Bender, G. S., 1985. **Dry Root Rot of Citrus-Factors which Increase the Susceptibility of Trees to infection by *Fusarium solani***. University of California, Riverside.
- Betancourt, R. I., Velázquez, M. J., Montero, C. J., Fernández, P. S., Lozoya, S. H., Rodríguez, A. G., 2012. ***Fusarium mexicanum* Agente Causal de la Malformación de Mango en Jalisco, México**. Revista Mexicana de Fitopatología. 30:115-127.
- Booth, C. 1986. **The genus *Fusarium***. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Reino Unido. 237 p.
- Britz, H., Steenkamp, E. T., Coutinho T. A, Wingfield, B. D., Marasas, W. F. O., and Wingfield, M. J. 2002. **Two new species of *Fusarium* section *Liseola* associated with mango malformation**. Mycology 94: 722-730.
- Costa, S. S., Matos, K. S., Tessman, D. J., Seixas, C. Pfenning, L. H. 2016. ***Fusarium paranaense* sp. nov., a member of the *Fusarium solani* species complex causes root rot on soybean in Brazil**. Fungal Biology. 120:51-60.
- Dandurand, L. M., Menge, J. A. 1992. **Influence of *Fusarium solani* on citrus root rot caused by *Phytophthora parasitica* and *Phytophthora citrophthora***. Plant and Soil. 144:13-21.
- Elmer, W. H. 2015. **Management of *Fusarium* crown and root rot of asparagus**. Crop Protection 73:2-6.



Elmer, W. H., Johnson, D. A., Mink, G. J. 1996. **Epidemiology and management of diseases causal to asparagus decline**. Plant disease 80:117-125.

Figueroa-Rivera, M. G., Rodriguez-Guerra, R., Guerrero-Aguilar, B. Z., González-Chavira, M. M., Pons-Hernández, J. L. 2010. **Caracterización de especies de *Fusarium* asociadas a la pudrición de raíz de maíz en Guanajuato, Mexico**. Revista Mexicana de Fitopatología 28:124-134.

Gaetán, S. A., Madia, M. S., Perez, A. 2007. **Recent outbreak of *Fusarium* crown and root rot caused by *Fusarium solani* in marjoram in Argentina**. Australian Plant Disease Notes. 2:15-16.

Geiser, M. D., Aoki, T., Bacon, W. C., Baker, E. S., Bhattacharyya, K., Brandt, E., Brown, W., Burgess, W., Chulze, S., Coleman, J., Correll, J., Covert, S., Crous, W. P., Cuomo, A. C., Sybern de Hoog, G., Di-Pietro, A., Elmer, H. W., Epstein, L., Frandsen, J. N., Freeman, S., Gagkaeva, T., Glenn, A., Gordon, T., Gregory F. N., Hammond-Kosack, K., Hanson, E. L., Jimenez-Gasco, M., Kang, S., Kistler, C., Kaldau, G., Leslie, F. J., Logrieco, A., Lu, G., Lysøe, E., Ma, L., McCormick, S., Mmigheli, Q., Moretti, A., Munaut, F., O'Donnell, K., Pfenning, L., Ploetz, C. R., Proctor, H. R., Rehner, A. S., Robert, A. R. G., Rooney, A., Salleh, B., Scandiani, M. M., Scauflaire, J., Short, P. G. D., Steenkamp, E., Suga, H., Summerell, B., Sutton, A. D., Thrane, U., Trail, F., Diepeningen, V. A., VanEtten, D. H., Viljoen, A., Waalwijk, C., Ward, J. T., Wingfield, J. M., Xu, J., Yang, B., Yli-Mattila, T., Zhang, N. 2013. **One Fungus, One Name; Defining the Genus *Fusarium* in a Scientifically Robust Way That Preserves Longstanding Use**. Phytopathology, 103:400-408.

Koyyappurath, S., Atuahiva, T., Le Guen, R., Batina, H., Le Squin, S., Gautheron, N., Edel Hermann, V., Peribe, J., Jahiel, M., Steinberg, C., Liew, E. C., Alabouvette, C., Beese, P., Dron, M., Sache, I., Laval, V., Grisoni, M. 2015. ***Fusarium***

***oxysporum f. sp. radicis-vanillae* is the causal agent of root and stem rot of vanilla.** Plant Pathology. 1-14.

Lara, C. B. N. 2008. **Variabilidad Fenotípica y Patogénica de *Phytophthora cinnamomi* Rands en la Franja Aguacatera del Estado de Michoacán.** Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Nayarit. 67 p.

Leslie, J. F. and Summerell, B. A. 2006. **The *Fusarium* Laboratory Manual.** Blackwell Publishing. Iowa, USA. 387 p.

Mejía, A. L. A. 2008. **Estudio fitopatológico en el laboratorio de diagnóstico fitosanitario de la unidad de normas y regulaciones del ministerio de agricultura y centro de diagnóstico parasitológico de la facultad de agronomía de la universidad de San Carlos de Guatemala.** Tesis Licenciatura. Universidad de San Carlos, Guatemala. 163 p.

Mendel, Z., Protesov, A., Sharon, M., Zveibil, A., Ben-Yehuda, S., O'Donnell, K., Rabaglia, R., Wysoki, M., Freeman, S. 2012. **An Asian ambrosia beetle *Ewallacea fornicatus* and its novel symbiotic fungus *Fusarium* sp. pose a serious threat to the Israeli avocado industry.** Phytoparasitica. 40:235-238.

Misra. A. K., 2006. **Wilt of Guava Disease of National Importance.** Indian Phytopathology, 59:269.

Ohr, H. D., Zentmyer, G. A., Menge, J. A. 1991. **Avocado root rot.** University of California cooperative extension Publication 110:3-20.

Ortoneda, M., Guarro J., Madrid, M., Caracuel, Z., Roncero, M. I., Mayayo, E., Di Pietro, A. 2003. ***Fusarium oxysporum* as a Multihost Model for the Genetic Dissection of Fungal Virulence in Plants and Mammals.** Infection and immunity 72:1760-1766.

- Ploetz, R. C. 2003. **Diseases of Mango**. Pp. 327-363. *In: Diseases of Tropical Fruit Crops*. CAB International. Willingford, UK. 512 p.
- Ploetz, R. C. 2006. **Diseases of Tropical Perennial Crops: Challenging Problems in Diverse Environments**. *Plant Disease*, 91:644-663.
- Ploetz, R., Peña, J. E. 2007. **Laurel wilt: a lethal disease on avocado and other Lauraceous hosts**. University of Florida. IFAS, TREC website. P. 1-6.
- Schroers, H. J.; R.P. Baayen; J.P. Meffert; J. de Gruyter; M. Hooftman and K. O'Donnell. 2004. ***Fusarium foetens*, a new species pathogenic to begonia elatior hybrids (Begonia 3 hiemalis) and the sister taxon of the *Fusarium oxysporum* species complex**. *Mycology*, 96: 393–406.
- Steenkamp, E., Britz, H., Coutinho, T., Wingfield, B., Marasas, W. and Wingfield, M. 2000. **Molecular characterization of *Fusarium subglutinans* associated with mango malformation**. *Molecular Plant Pathology*. 1:187-193.
- Summerell, A. B., Salleh, B. Leslie, F. J. 2003. **A Utilitarian Approach to *Fusarium* Identification**. *Plant Disease*. 87:117-128.
- Suppo, R. F. 1992. **El aguacate**. AGT.S. A. 167 p.
- Thangavelu R., Kumar, M. K.; Devi, G. P., Mustaffa, M. M. 2012. **Genetic Diversity of *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense Isolates (Foc) of India by Inter simple Sequence Repeats (ISSR) Analysis**. *Molecular Biotechnology*, 51:203-211.
- Tomoika, K., Hirooka, Y., Takezaki, A., Aoiki, T., Sato, T. 2011. ***Fusarium* root rot of praire gentian caused by a species belonging to the *Fusarium solani* species complex**. *Journal of General Plant Pathology*, 77:132-135.

Trigiano, N. R., Windham, T. M., Windham, S. A. 2004. **Plant Pathology, Concepts and Laboratory Exercises**. CRC PRESS. 413 p.

Ullstrup, A. 1970. **Method for inoculating corn ears with *Gibberella zeae* and *Diplodia maidis***. Plant Disease report. 54:658-662.

Zaccardelli, L., Vitale, S., Luongo, L., Meright, M., Corazza, L. 2008. **Morphological and Molecular Characterization of *Fusarium solani* isolates**. Journal of Phytopathology. 156:534-541.

## CONCLUSIONES GENERALES

Con base a los resultados obtenidos en los tres capítulos se concluyó lo siguiente:

- De muestreos realizados en 10 localidades pertenecientes a la franja aguacatera del estado de Michoacán se obtuvieron 19 aislados pertenecientes a *Fusarium* spp.
- Con la caracterización cultural y morfológica se determinó que 15 cepas pertenecen a *Fusarium oxysporum* Schlechtendahl (Snyder & Hansen) y las cuatro restantes a *Fusarium solani* (Martius) Appel & Wollenweber (Snyder & Hansen).
- El análisis filogenético derivado de la caracterización molecular confirmó que las cepas pertenecen a *Fusarium oxysporum* Schl. Y *Fusarium solani* Mart.
- *Fusarium solani* Mart. Y *Fusarium oxysporum* Schl. resultaron ser patogénicos en plantas de *Persea americana* Miller variedad *drymifolia*.
- *Fusarium oxysporum* Schl. Fue mas virulento que *F. solani* Mart.
- *Fusarium oxysporum* Schl. Y *Fusarium solani* Mart. Ocasionaron pudrición radical, amarillamiento, marchitez y necrosis apical en los casos mas severos.

## APÉNDICE

### Secuencias Factor de Elongación

#### F1

CCCCGTGTTTCGTCGTCATCGGACACGTCGACTCTGGCAAGTCGACCACTGTGAGTACTCTCCTTGACAATGAGCT  
TATCTGCCATCGTCAATCCCGACCAAGACCTGGCGGGGTATTTCTCAAAGTCAACATACTGACATCGTTTTACAG  
ACCGGTCACCTTGATCTACCAGTGCAGTGGTATCGACAAGCGAACCATCGAGAAGTTCGAGAAGGTTAGTTACTTT  
CCCTTCGATCGCGCGTCTTTTGCCCATCGATTTCCCTACGACTCGAAACGTGCCCGCTACCCCTCTCGAGACCA  
AAAATTTTGCAATATGACCGTAATTTTTTTTTGGTGGGGCATTACCCCGCCCTCGGGTGGCGGGCGGTTTTGCC  
TCTTACCATTCTCACAACCTCAATGAGCGCATCGTCACGTGTCAAGCAGTCACTAACCATTCAACAATAGGAAGC  
CGCTGAGCTCGGTAAGGGTTCTTCAAGTACGCCTGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTAT  
CACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTTCGAGACTCCTCGCTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTGTCTCAT  
GCTTCATTCTACTTCTCTTCGTACTAACACATCACTCAGACGCTCCCGGTCACCGTGATTTTCATCAAGAACATGA  
TCACTGGGTACCCTCCCAATA

#### F2

GCACATATGGATGTCATCGGCACGTCGACTCTGGCAGTCGACCACTGTGAGTATCTCCTCGACAATGAGCTTATC  
TGCCATCGTCAATCCCGACCAAGACCTGGCGGGGTATTTCTCAAAGTCAACATACTGACATCGTTTTACAGACCG  
GTCACCTTGATCTACCAGTGCAGTGGTATCGACAAGCGAACCATCGAGAAGTTCGAGAAGGTTAGTCACTTTCCCT  
TCGATCGCGCGTCTTTTGCCCATCGATTTACCTACGACTCGAAACGTGCCCGCTACCCCGCTCGAGACCAAAAA  
TTTTTGCAATATGACCGTAATTTTTTTTTGGTGGGGCATTACCCCGCCACTTGAGCGACGGGAGCGTTTTGCCCTCT  
TAACCATTCTCACAACCTCAATCAGTGCCTCGTCACGTGTCAAGCAGTCACTAACCATTCAACAATAGGAAGCCG  
CTGAGCTCGGTAAGGGTTCTTCAAGTACGCCTGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCA  
CCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTTCGAGACTCCTCGCTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTGTCTCTCATGC  
TTCATTCTACTTCTCTTCGTACTAACATATCACTCAGACGCTCCCGGTCACCGTGATTTTCATCAAGAACATGATC  
ACTGGTACCTCCCATCCAA

#### F3

ACAATAGTCGTGGTAATCGGCCACGTCGACTCTGGCAAGTCGACCACTGTGAGTACTCTCCTCGACAATGAGCTT  
ATCTGCCATCGTCAATCCCGACCAAGACCTGGCGGGGTATTTCTCAAAGTCAACATACTGACATCGTTTTACAGA  
CCGGTCACTTGATCTACCAGTGCAGTGGTATCGACAAGCGAACCATCGAGAAGTTCGAGAAGGTTAGTCACTTTTC  
CCTTCGATCGCGCGTCTTTTGCCCATCGATTTACCTACGACTCGAAACGTGCCCGCTACCCCGCTCGAGACCAA  
AAATTTTGCAATATGACCGTAATTTTTTTTTGGTGGGGCATTACCCCGCCACTTGAGCGACGGGAGCGTTTTGCC  
TCTTAACCATTCTCACAACCTCAATCAGTGCCTCGTCACGTGTCAAGCAGTCACTAACCATTCAACAATAGGAAG  
CCGCTGAGCTCGGTAAGGGTTCTTCAAGTACGCCTGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTA  
TCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTTCGAGACTCCTCGCTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTGTCTCTCA  
TGCTTCATTCTACTTCTCTTCGTACTAACATATCACTCAGACGCTCCCGGTCACCGTGATTTTCATCAAGAACATG  
ATCACTGGTACCTCCACCAA

#### F4

ACAACATTGATCGTCATCGGCCACGTCGACTCTGGCAAGTCGACCACCGTAAGTCAAACCCTCATCGCGATCTGC  
TTATCTCGGGTTCGTGGAACCCCGCCTGGTATCACGGGCGGGGTATTCATCAGTCACTTCATGCTGACAACCATCT  
ACAGACCGGTCACCTTGATCTACCAGTGCAGTGGTATCGACAAGCGAACCATCGAGAAGTTCGAGAAGGTTGGTGA  
CATCTCCCCCGATCGCGCCCTGCTATTCCACATCGGATTCCCCGTCGAATCCCTCCTCCCGACACGCTCTGCG  
CCCGCTTCTCCCGAGTCCCAAAAATTTTGCGGTTTGACCGTAATTTTTTTTTGGTGGGGCATTACCCCGCCACTC  
GGGCGACGTTGTACAAAGCCCTGATCCCTGCACACAAAAACACCAACCCTCTTGCGCGCATCACGTGGTTCA  
CAACAGACTGACTGGTTCAACAATAGGAAGCCGCTGAGCTCGGTAAGGGTTCTTCAAGTACGCCTGGGTCCT  
TGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTTCGAGACTCCCCGCTA  
CTATGTCACCGTCATTGGTATGTCGCCCTCATCTCCCTCACTCAGTCTCATCTCTAACAGTCAATAGACGCCCC  
CGGCCACCGTGATTTTCATCAAGAACATGATCACTGGTACCTCCACAAAA

#### F5

ACAAATTTGTCGTCATCGGGACCGTCGACTCTGGCAAGATCGACCACTGTGAGTACTCTCCTTGACAATGAGCTT  
ATCTGCCATCGTCAATCCCGACCAAGACCTGGCGGGGTATTTCTCAAAGTCAACATACTGACATCGTTTTACAGA

CCGGTCACTTGATCTACCAGTGCGGTGGTATCGACAAGCGAACCATCGAGAAGTTCGAGAAGGTTAGTTACTTTC  
CCTTCGATCGCGCGTCTTTTGGCCATCGATTTCCCCTACGACTCGAAACGTGCCCGCTACCCCTCTCGAGACCAA  
AAATTTTGCAATATGACCGTAATTTTTTTGGTGGGGCATTACCCCCGCCCTCGGGTGCCGGGCGCGTTTGGCCCT  
CTTACCATTCTCACAACCTCAATGAGCGCATCGTCACGTGTCAAGCAGTCACTAACCATTCAACAATAGGAAGCC  
GCTGAGCTCGGTAAGGGTTCCCTTCAAGTACGCCTGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATC  
ACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTTCGAGACTCCTCGCTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTGTGCTCATG  
CTTCACTTCTACTTCTCTTCTGTAACACATCACTCAGACGCTCCCGGTACCCGTGATTTTCATCAAGAACATGAT  
CACTGGTACTTCCCAAAA

**F6**

GAAACTTTTCGATCGTCATCGGCCACGTGCGACTCTGGCAGTGCACCACCGTAAGTCAAACCCTCATCGCGATCTGC  
TTATCTCGGGTTCGTTGAACCCCCGCTGGTATCACGGGCGGGGTATTTCATCAGTCACTTCATGCTGACAACCATCT  
ACAGACCGGTCACTTGATCTACCAGTGCGGTGGTATCGACAAGCGAACCATCGAGAAGTTCGAGAAGGTTGGTGA  
CATCTCCCCCGATCGCGCCCTGCTATTCCACATCGGATTCCCCGTGAATCCCCTCCTCCGCGACACGCTCTGCG  
CCCCGTTCTCCCGAGTCCCAAAAATTTTTGGCGTTTGACCGTAATTTTTTTTTGGTGGGGCATTACCCCCGCCACTC  
GGGCGACGTTGTACAAAGCCCTGATCCCTGCACACAAAAAACACCAACCCTCTTGGCGCGCATCACGTGGTTCA  
CAACAGACACTGACTGGTTCAACAATAGGAAGCCGCTGAGCTCGGTAAGGGTTCCCTTCAAGTACGCCTGGGTCTT  
TGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTTCGAGACTCCCCGCTA  
CTATGTCACCGTCATTGGTATGTCGCCCTCATCTCCCTCACTCACGTCTCATCTCTAACAGTCAATAGACGCCCC  
CGGCCACCGTGATTTTCATCAAGAACATGATCACTGGTACCTCACTCAAATA

**F7**

CCGCTTTTGATGTCATCGGACACGTGCGACTCTGGCAGTGCACCCTGTGAGTACTCTCCTCGACAATGAGCTTAT  
CTGCCATCGTCAATCCCGACCAAGACCTGGCGGGGTATTTCTCAAAGTCAACATACTGACATCGTTTTACAGACC  
GGTCACTTGATCTACCAGTGCGGTGGTATCGACAAGCGAACCATCGAGAAGTTCGAGAAGGTTAGTACTTTCCCT  
TCGATCGCGCGTCTTTTGGCCATCGATTTCCCCTACGACTCGAAACGTGCCCGCTACCCCGCTCGAGACCAAAAA  
TTTTTGCAATATGACCGTAATTTTTTTGGTGGGGCATTACCCCCGCCACTTGAGCGACGGGAGCGTTTGGCCCTCT  
TACCTTCTCACAACCTCAATGAGTGCCTCGTCACGTGTCAAGCAGTCACTAACCATTCAACAATAGGAAGCCGCT  
GAGCTCGGTAAGGGTTCCCTTCAAGTACGCCTGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCAC  
ATCGATATTGCTCTCTGGAAGTTCGAGACTCCTCGCTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTGTGCTCATGCTT  
CATTCTACTTCTCTTCTGTAACATATCACTCAGACGCTCCCGGTACCCGTGATTTTCATCAAGAACATGATCAC  
TGGTACTTTCCCTCATA

**F8**

CCCCACATCGATGGTATCGGCCACGTGCGACTCTGGCAGTGCACCCTGTGAGTACTCTCCTCGACAATGAGCATA  
TCTGCCATCGTCAATCCCGACCAAGACCTGGCGGGGTATTTCTCAAAGTCAACATACTGACATCGTTTTACAGAC  
CGGTCACTTGATCTACCAGTGCGGTGGTATCGACAAGCGAACCATCGAGAAGTTCGAGAAGGTTAGTCACTTTCC  
CTTCAATCGCGCGTCTTTTGGCCATCGATTTCCCCTACGACTCGAAACGTGCCCGCTACCCCGCTCGAGACCAAA  
AATTTTGCAATATGACCGTAATTTTTTTGGTGGGGCATTACCCCCGCCACTTGAGCGACGGGAGCGTTTGGCCCTC  
TTACCATTCTCACAACCTCAATGAGTGCCTCGTCACGTGTCAAGCAGTCACTAACCATTCAACAATAGGAAGCCG  
CTGAGCTCGGTAAGGGTTCCCTTCAAGTACGCCTGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCA  
CCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTTCGAGACTCCTCGCTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTGTGCTCATGC  
TTCATTCTACTTCTCTTCTGTAACATATCACTCAGACGCTCCCGGTACCCGTGATTTTCATCAAGAACATGATC  
ACTGGGTACCTTCCATCAAA

**F9**

ACCTACTTTGGTTCGATCGGCCACGTGCGACTCTGGCAAGTGCACCCTGGAGTACTCTCCTCGACAATGAGCATA  
TCTGCCATCGTCAATCCCGACCAAGACCTGGCGGGGTATTTCTCAAAGTCAACATACTGACATCGTTTTACAGAC  
CGGTCACTTGATCTACCAGTGCGGTGGTATCGACAAGCGAACCATCGAGAAGTTCGAGAAGGTTAGTCACTTTCC  
CTTCAATCGCGCGTCTTTTGGCCATCGATTTCCCCTACGACTCGAAACGTGCCCGCTACCCCGCTCGAGACCAAA  
AATTTTGCAATATGACCGTAATTTTTTTGGTGGGGCATTACCCCCGCCACTTGAGCGACGGGAGCGTTTGGCCCTC  
TTACCATTCTCACAACCTCAATGAGTGCCTCGTCACGTGTCAAGCAGTCACTAACCATTCAACAATAGGAAGCCG  
CTGAGCTCGGTAAGGGTTCCCTTCAAGTACGCCTGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCA  
CCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTTCGAGACTCCTCGCTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTGTGCTCATGC  
TTCATTCTACTTCTCTTCTGTAACATATCACTCAGACGCTCCCGGTACCCGTGATTTTCATCAAGAACATGATC  
ACTGGGTACTTCCCAAAA

**F10**

ACCACGTCGATGTATCGGCACGTCGACTCTGGCAGTCGACCACTGTGAGTACTCTCCTCGACAATGAGCATATCT  
GCCATCGTCAATCCCGACCAAGACCTGGCGGGGTATTTCTCAAAGTCAACATACTGACATCGTTTTACAGACCGG  
TCACTTGATCTACCAGTGCAGTGGTATCGACAAGCGAACCATCGAGAAGTTTCGAGAAGGTTAGTCACTTTCCCTT  
CAATCGCGCGTCCTTTGCCCATCGATTTCCCTACGACTCGAAACGTGCCCGCTACCCCGCTCGAGACCAAAAAA  
TTTGCAATATGACCGTAATTTTTTTGGTGGGGCACTTACCCCGCCACTTGAGCGAAGGGAGCGTTTTGCCCTCTTA  
CCATTCTCACAACCTCAATGAGTGCCTGTCACGTGTGAAGCAGTCACTAACCATTCAACAATAGGAAGCCGCTG  
AGCTCGGTAAGGGTTCCCTTCAAGTACGCCTGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACC  
TCGATATTGCTCTCTGGAAGTTCGAGACTCCTCGCTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTTC  
ATTCTACTTCTCTTCGTACTAACATATCACTCAGACGCTCCCGGTACCCGTGATTTTCATCAAGAACATGATCACT  
GGTACTTCCCAAAAAA

**F11**

CCCCACGTCGTCGTCATCGGCACGTCGACTCTGGCAGTCGACCACTGTGAGTACTCTCCTCGACAATGAGCTTAT  
CTGCCATCGTCAATCCCGACCAAGACCTGGTGGGGTATTTCTCAAAGTCAACATACTGACATCGTTTTACAGACC  
GGTCACTTGATCTACCAGTGCAGTGGTATCGATAAGCGAACCATCGAGAAGTTTCGAGAAGGTTAGTCACTTTCC  
TTCGATCGCGCGTCCTTTGCCCATCGATTTCCCTACGACTCGAAACGTGCCCGCTACCCCGCTCGAGACCAAAA  
ATTTTGCAATATGACTGTAATTTTTTTGGTGGGGCACTTACCCCGCCACTTGAGCGACGGGAGCGTTTTGCCCTC  
TTAACATTCTCACAACCTCAATGAGTGCCTGTCACGTGTGAAGCAGTCACTAACCATTCAACAATAGGAAGCC  
GCTGAGCTCGGTAAGGGTTCCCTTCAAGTACGCCTGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATC  
ACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTTCGAGACTCCTCGCTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTGTCGCTCATG  
CTTCATTCTACTTCTCTTCGTACTAACATCACTCAGACGCTCCCGGTACCCGTGATTTTCATCAAGAACATGATCA  
CTGGTACCTCCAAAAATA

**F12**

CCCAAAGTTGATGGTATCGGCACGTCGACTCTGGCAGTCGACCACTGTGAGTACTCTCCTCGACAATGAGCTTAT  
CTGCCATCGTCAATCCCGACCAAGACCTGGTGGGGTATTTCTCAAAGTCAACATACTGACATCGTTTTACAGACC  
GGTCACTTGATCTACCAGTGCAGTGGTATCGATAAGCGAACCATCGAGAAGTTTCGAGAAGGTTAGTCACTTTCC  
TTCGATCGCGCGTCCTTTGCCCATCGATTTCCCTACGACTCGAAACGTGCCCGCTACCCCGCTCGAGACCAAAA  
ATTTTGCAATATGACTGTAATTTTTTTGGTGGGGCACTTACCCCGCCACTTGAGCGACGGGAGCGTTTTGCCCTC  
TTAACATTCTCACAACCTCAATGAGTGCCTGTCACGTGTGAAGCAGTCACTAACCATTCAACAATAGGAAGCC  
GCTGAGCTCGGTAAGGGTTCCCTTCAAGTACGCCTGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATC  
ACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTTCGAGACTCCTCGCTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTGTCGCTCATG  
CTTCATTCTACTTCTCTTCGTACTAACATCACTCAGACGCTCCCGGTACCCGTGATTTTCATCAAGAACATGATCA  
CTGGTACCTCC

**F13**

ACGTACTTTTCGTCGGTATCGGCCACGTCGACTCTGGCAAGTCGACCACTGTGAGTACTCTCCTCGACAATGAGCA  
TATCTGCCATCGTCAATCCCGACCAAGACCTGGCGGGGTATTTCTCAAAGTCAACATACTGACATCGTTTTACAG  
ACCGGTCACTTGATCTACCAGTGCAGTGGTATCGACAAGCGAACCATCGAGAAGTTTCGAGAAGGTTAGTCACTTT  
CCCTTCAATCGCGCGTCCTTTGCCCATCGATTTCCCTACGACTCGAAACGTGCCCGCTACCCCGCTCGAGACCA  
AAAATTTTGCAATATGACCGTAATTTTTTTGGTGGGGCACTTACCCCGCCACTTGAGCGAAGGGAGCGTTTTGTCC  
TCTTACCATTCTCACAACCTCTCTGAGTGTGCGTCAAGTGTGAAGCAGTCCCTCACCATTTTACCATACAAACA  
CGCTCAGTTGAAAATGGTGCCTTCGCTAAGCCTGGGTTTCGGTACCCCTGGATCGCCTGGGTTTGTGAC

**F14**

CAGAGATCATGTATCGGACCGTCGACTCTGGCAAGTCGACCACCGTAAGTCAAACCCCTCATCGCGATCTGCTTAT  
CTCGGGTCGTGGAACCCCGCCTGGTATCACGGGCGGGGTATTCATCAGTCACTTCATGCTGACAACCATCTACAG  
ACCGGTCACTTGATCTACCAGTGCAGTGGTATCGACAAGCGAACCATCGAGAAGTTTCGAGAAGGTTGGTGACATC  
TCCCCCGATCGCGCCCTGCTATTCCACATCGGATTTCCCGTCAATCCCTCCTCCGCGACACGCTCTGCGCCCG  
CTTCTCCCGAGTCCCAAAAATTTTTGCGGTTTTGACCGTAATTTTTTTGGTGGGGCATTTACCCCGCCACTCGGGC  
GACGTTGTACAAAGCCCTGATCCCTGCACACAAAAAACCAAACCCCTCTTGGCGCGCATCACGTGGTTTCAACA  
AGACTGACTGGTTCAACAATAGGAAGCCGCTGAGCTCGGTAAGGGTTCCCTTCAAGTACGCCTGGGTTCTTGC  
AAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTTCGAGACTCCCGCTACTAT



GTCACCGTCATTGGTATGTGCGCCCTCATCTCCCTCACTCACGTCTCATCTCTAACAGTCAATAGACGCCCCCGGC  
CACCGTGATTTTCATCAAGAACATGATCACTGGTACCTCCCCACAATA

**F15**

CCACGTTGTCGTATCGGCACGTGCGACTCTGGCAAGTCGACCCTGTGAGTACTCTCCTCGACAATGAGCTTATCT  
GCCATCGTCAATCCCGACCAAGACCTGGCGGGGTATTTCTCAAAGTCAACATACTGACATCGTTTTACAGACCGG  
TCACTTGATCTACCAGTGCGGTGGTATCGACAAGCGAACCATCGAGAAGTTTCGAGAAGGTTAGTCACTTTCCCTT  
CGATCGCGCGTCTTTGCCCATCGATTTCCCTACGACTCGAAACGTGCCCCGCTACCCCGCTCGAGACCAAAAAT  
TTTGCAATATGACCGTAATTTTTTTTCGGTGGGGCACTTACCCCGCCACTTGAGCGACGGGAGCGTTTTGCCCTCTT  
ACCATTCTCACAACCTCAATGAGTGCGTTCGTACGTGTCAAGCAGTCACTAACCATTCAACAATAGGAAGCCGCT  
GAGCTCGGTAAGGGTTCCTTCAAGTACGCCTGGGTTCCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACC  
ATCGATATTGCTCTCTGGAAGTTCGAGACTCCTCGCTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTGTCGTTTCATGCTT  
CATTCTACTTCTCTTCGTACTAACATATCACTCAGACGCTCCCGGTACCGTGATTTTCATCAAGAACATGATCAT  
GGGTTACCTTCCAACCCAA

**F16**

CCACTGGTTGATGTATCGGCACGTGCGACTCTGGCAGTCGACCCTGTGAGTACTCTCCTCGACAATGAGCTTATC  
TGCCATCGTCAATCCCGACCAAGACCTGGCGGGGTATTTCTCAAAGTCAACATACTGACATCGTTTTACAGACCG  
GTCACCTTGATCTACCAGTGCGGTGGTATCGACAAGCGAACCATCGAGAAGTTTCGAGAAGGTTAGTCTTTCCCTT  
CGATCGCGCGTCTTTGCCCATCGATTTCCCTACGACTCGAAACGTGCCCCGCTACCCCGCTCGAGACCAAAAAT  
TTTGCAATATGACCGTAATTTTTTTTCGGTGGGGCACTTACCCCGCCACTTGAGCGACGGGAGCGTTTTGCCCTCTT  
ACCATTCTCACAACCTCAATGAGTGCGTTCGTACGTGTCAAGCAGTCACTAACCATTCAACAATAGGAAGCCGCT  
GAGCTCGGTAAGGGTTCCTTCAAGTACGCCTGGGTTCCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACC  
ATCGATATTGCTCTCTGGAAGTTCGAGACTCCTCGCTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTGTCGTTTCATGCTT  
CATTCTACTTCTCTTCGTACTAACATATCACTCAGACGCTCCCGGTACCGTGATTTTCATCAAGAACATGATCAC  
TGGGTACTTCCCACAAA

**F17**

ACCCAGTTGATGTCATCGGCACGTGCGACTCTGGCAGTCGACCCTGTGAGTACTCTCCTCGACAATGAGCTTATC  
TGCCATCGTCAATCCCGACCAAGACCTGGCGGGGTATTTCTCAAAGTCAACATACTGACATCGTTTTACAGACCG  
GTCACCTTGATCTACCAGTGCGGTGGTATCGACAAGCGAACCATCGAGAAGTTTCGAGAAGGTTAGTCACTTTCCCT  
TCGATCGCGCGTCTTTGCCCATCGATTTACCTACGACTCGAAACGTGCCCCGCTACCCCGCTCGAGACCAAAA  
TTTTGCAATATGACCGTAATTTTTTTTGGTGGGGCACTTACCCCGCCACTTGAGCGACGGGAGCGTTTTGCCCTCT  
TAACCATTCTCACAACCTCAATCAGTGCGTTCGTACGTGTCAAGCAGTCACTAACCATTCAACAATAGGAAGCCG  
CTGAGCTCGGTAAGGGTTCCTTCAAGTACGCCTGGGTTCCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCA  
CCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTTCGAGACTCCTCGCTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTGTCGTTTCATGCT  
TTCATTCTACTTCTCTTCGTACTAACATATCACTCAGACGCTCCCGGTACCGTGATTTTCATCAAGAACATGATC  
ACTGGTACCTCCCCAAAAA

**F18**

ACCCTTGTCATGTATCGGCCGTCGACTCTGGCAAGTCGACCCTGTGAGTACTCTCCTTGACAATGAGCTTATCT  
GCCATCGTCAATCCCGACCAAGACCTGGCGGGGTATTTCTCAAAGTCAACATACTGACATCGTTTTACAGACCGG  
TCACTTGATCTACCAGTGCGGTGGTATCGACAAGCGAACCATCGAGAAGTTTCGAGAAGGTTAGTACTTTCCCTT  
CGATCGCGCGTCTTTGCCCATCGATTTCCCTACGACTCGAAACGTGCCCCGCTACCCCTCTCGAGACCAAAAAT  
TTTGCAATATGACCGTAATTTTTTTTGGTGGGGCACTTACCCCGCCCTCGGGTGCCGGGCGCGTTTTGCCCTCTTA  
CCATTCTCACAACCTCAATGAGCGCATCGTTCAGTGTCAAGCAGTCACTAACCATTCAACAATAGGAAGCCGCTG  
AGCTCGGTAAGGGTTCCTTCAAGTACGCCTGGGTTCCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACC  
TCGATATTGCTCTCTGGAAGTTCGAGACTCCTCGCTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTGTCGCTCATGCTTC  
ATTCTACTTCTCTTCGTACTAACACATCACTCAGACGCTCCCGGTACCGTGATTTTCATCAAGAACATGATCACT  
GGGTAGCTTCCCACAAA

**F19**

GAAAAGATTGTTTCGTCATCGGCACGTGCGACTCTGGCAAGTCGGACCACCGTAAGTCAAACCTCATCGCGATCTG  
CTTATCTCGGGTCGTGGAACCCCGCTGGTATCACGGGCGGGGTATTCATCAGTCACTTCATGCTGACAACCATC  
TACAGACCGGTCACTTGATCTACCAGTGCGGTGGTATCGACAAGCGAACCATCGAGAAGTTTCGAGAAGGTTGGT  
ACATCTCCCCGATCGCGCCCTGCTATTCCACATCGGATTCCTCGTCAATCCCTCCTCCGCGACACGCTCTGC  
GCCCCCTTCTCCCGAGTCCCAAAAATTTTTCGGTGGGGCACTTACCCCGCCACT

CGGGCGACGTTGTACAAAGCCCTGATCCCTGCACACAAAAACACCAAACCCCTCTTGGCGCGCATCACGTGGTTTC  
ACAACAGACACTGACTGGTTCAACAATAGGAAGCCGCTGAGCTCGGTAAGGGTTCCCTTCAAGTACCCCTGGGTCC  
TTGACAAGCTCAAGGGCGAGAGTGAGCGTGGTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTTCCAGACACCCCCCT  
ACTATGTCACCGCCCTTGGTATGTCGCCCCCCCCAATTCCTTTCCCGTTTCATTTGTTACAGTAGAAAAAGACC  
CCGGGCCACCGGATTCTTCAAAAAATAAGCCCTGGTGCTTCC

## Secuencias Calmodulina

### F1

CCTGGAGCTTTACATCTTGTTCGCCGCTTGCCTCGCCGCGTCTTGCTAGAAGCTGTCGCTAACCTCTTTAT  
GTAGGACAAGGATGGCGATGGTGAGTGATGCTCCCTTTCCGCGATGTTTCTTCGTTGGCCCCGTGCGAAAC  
CCAAATCGATCCAACAAAGCATCAGACCACTATAACTCTTTACATCTCTTTCTATGCGATATTCTTAAATCG  
AAAAATGAGCTAAACGCCTCGCTCTAGGCCAGATTACTACCAAGGAGCTCGGTACCGTTATGCGCTCTCTC  
GGCCAGAACCCCTCCGAGTCTGAGCTTCAGGACATGATCAACGAGGTTGACGCCGACAACAACGGCACCATC  
GACTTTCCTGGTGCGTAATATTCCAAGACGATTAGAGGACGGTCAGTACTAACCATTGGGTAAAGAGTTCCT  
CACCATGATGGCGCGCAAGATGAAGGATACCGACTCTGAGGAGGAGATCCGCGAGGCTTTCAAGGTGTTTCA  
CCGTGACAACAACGGTTTTCATTTCTGCTGCTGAGCTTCGACATGTCATGACCTCCATCGGCGAGAAGCTCAC  
TGATGATGAGGTTGATGAGATGATCCGAGAGGCTGACCAGGACGGCGATGGCCGAATCGACTGTGAGTTGCT  
TGAGATTAGATATATAGTACCAACGTCCAGTTACTGACAAGACTATAGACAACGAGTTCGTCCAACCTCATGA  
TGCAAAAAATAAAA

### F2

CCTGAGCATTTCATCTTGTTCGCCGCTTGCCTCGCCGCGTCTTGCTAGAAGCTGTCGCTAACCTCTTTATGT  
AGGACAAGGATGGCGATGGTGAGTGATGCTCCCTTTCCGCGATGTTTCTTCGTTGGCCCCGTGCGAAACCC  
AAATCGATCCAGCAAAGCATCAGACCACTATAACTCTTTACATCTCTTTCTATGCGATATTCTTAAATCGAA  
AACATGAGCTAAACGCCTCGCTCTAGGCCAGATTACCACCAAGGAGCTCGGTACCGTTATGCGCTCTCTCGG  
CCAGAACCCCTCCGAGTCTGAGCTTCAGGACATGATCAACGAGGTTGACGCCGACAACAACGGCACCATCGA  
CTTCTCTGGTGCGTAATATTCCAAGACGATTAGAGGACGGTCAGTACTAACCATTGGGTAAAGAGTTCCTCA  
CCATGATGGCGCGCAAGATGAAGGATACCGACTCTGAGGAGGAGATCCGCGAGGCTTTCAAGGTGTTTCA  
GTGACAACAACGGTTTTCATTTCTGCTGCTGAGCTTCGACATGTCATGACCTCCATCGGCGAGAAGCTCACTG  
ATGATGAGGTTGATGAGATGATCCGAGAGGCTGACCAGGACGGCGATGGCCGAATCGACTGTGAGTTGCTTG  
AGATTAGATATATAGTACCAACGTCCAGTTACTGACAAGACTATAGACAACGAGTTCGTCCAACCTCATATTG  
CAAAAAAAAAAAAAA

### F3

TCCTGGAGCATCCCTCTTGTTCGCCGCTTGCCTCGCCGCGTCTTGCTAGAAGCTGTCGCTAACCTCTTTAT  
GTAGGACAAGGATGGCGATGGTGAGTGATGCTCCCTTTCCGCGATGTTTCTTCGTTGGCCCCGTGCGAAAC  
CCAAATCGATCCAGCAAAGCATCAGACCACTATAACTCTTTACATCTCTTTCTATGCGATATTCTTAAATCG  
AAAAATGAGCTAAACGCCTCGCTCTAGGCCAGATTACCACCAAGGAGCTCGGTACCGTTATGCGCTCTCTC  
GGCCAGAACCCCTCCGAGTCTGAGCTTCAGGACATGATCAACGAGGTTGACGCCGACAACAACGGCACCATC  
GACTTTCCTGGTGCGTAATATTCCAAGACGATTAGAGGACGGTCAGTACTAACCATTGGGTAAAGAGTTCCT  
CACCATGATGGCGCGCAAGATGAAGGATACCGACTCTGAGGAGGAGATCCGCGAGGCTTTCAAGGTGTTTCA  
CCGTGACAACAACGGTTTTCATTTCTGCTGCTGAGCTTCGACATGTCATGACCTCCATCGGCGAGAAGCTCAC  
TGATGATGAGGTTGATGAGATGATCCGAGAGGCTGACCAGGACGGCGATGGCCGAATCGACTGTGAGTTGCT  
TGAGATTAGATATATAGTACCAACGTCCAGTTACTGACAAGACTATAGACAACGAGTTCGTCCAACCTCATGA  
TTGCAAAAAAAAAAAC

### F4

ATTTACCTAGCGTCTCTGCGTGATGCTCTATCGGTGCTCTGAGTGGCGATCTTTTGGCAAGGCTGTCGCTA  
ACCTCTTGCCTAGGACAAGGATGGCGATGGTGAGTGATTCTCCCTCCTGCTCGCAAAGCCCCCTCGTCGGTCT  
CAGCCCGATTCTTTTCCCGAATTACATGATGCACCAAACCTCTATGCGCACACTGCTCTTCACTCGATGCGA  
ATCGTTTCGAGACGGTAAACTAAACGTTTTCGTTCTAGGCCAGATCACCACCAAGGAGCTGGGTACCGTCATG  
CGCTCCCTCGGCCAGAACCCCTCCGAGTCTGAGCTTCAGGACATGATCAACGAGGTCGACGCCGACAACAAC  
GGCACCATCGACTTCCCTGGTGCGTAAACTTGACAAGCCTGGGCCGACGAAACAAGACTGACACTAGCGTC  
AAGAGTTCCTTACCATGATGGCGCGCAAGATGAAGGACACTGACTCCGAGGAGGAGATCCGTGAGGCTTTCA

AGGTTGGCAGGATCATGCTTCGCTGAAGCCTTGACATGCTAACTCACCGTCAGGTTTTTCGACCGTGACAACA  
ACGGCTTCATTTCTGCTGCTGAGCTCCGACACGTTATGACCTCCATCGGCGAGAAGCTTACCGATGACGAGG  
TTGATGAGATGATCCGGGAGGCTGACCAGGACGGTGATGGCCGAATCGACTGTGAGTCTCTCCGTCACCGC  
TGACGAAAAGTTGCTAGCAAAGCTTCCAATACTGACCACGACGATAGACAACGAGTTTGTCCAACATCATGAA  
TGCAAAAAAAAAAACA

**F5**

GCCTTAGCTTCCATCTTGTTTTCGCCGCTTGCCCTCGCCGCGTCTTGCTAGAAAGCTGTGCGTAACTCTTTATG  
TAGGACAAGGATGGCGATGGTGAGTGATGCTCCCCTTTCCGCGATGTTTCTTCGTTGGCCCCGTGCGAAACC  
CAAAATCGATCCAACAAAGCATCAGACCCTATAACTCTTTACATCTCTTTCTATGCGATATTCTTAAATCGA  
AAACATGAGCTAAACGCCTCGCTCTAGGCCAGATTACTACCAAGGAGCTCGGTACCGTTATGCGCTCTCTCG  
GCCAGAACCCCTCCGAGTCTGAGCTTCAGGACATGATCAACGAGGTTGACGCCGACAACAACGGCACCATCG  
ACTTTCTTGGTGCGTAATATTCCAAGACGATTAGAGGACGGTCAGTACTAACCATTGGGTAAAAGAGTTCCCTC  
ACCATGATGGCGCGCAAGATGAAGGATACCGACTCTGAGGAGGAGATCCGCGAGGCTTTCAAGGTGTTTCGAC  
CGTGACAACAACGGTTTTCATTTCTGCTGCTGAGCTTCGACATGTCATGACCTCCATCGGCGAGAAGCTCACT  
GATGATGAGGTTGATGAGATGATCCGAGAGGCTGACCAGGACGGCGATGGCCGAATCGACTGTGAGTTGCTT  
GAGATTAGATATATAGTACCAACGTCCAGTTACTGACAAGACTATAGACAACGAGTTTCGTCCAACATCATGAT  
TGCAAAAAAAAAAACA

**F6**

GAGATCGACGTGCTGCGTCTCATATGTGGTCTGAATGGCGATCTTTTGGCAAGGCTGTGCGTAACTCTTGC  
GTAGGACAAGGATGGCGATGGTGAGTGATTTCTCCCTCTGCTCGCAAAGCCCTCGTCGGTCTCAGCCCGAT  
TCTTTTCCCGAATTACATGATGCACCAAACCTCTATGCGCACACTGCTCTTCAGTCGATGCGAATCGTTTCG  
AGACGGTAAACTAAACGTTTTCGTTCTAGGCCAGATCACCACCAAGGAGCTGGGTACCGTCATGCGCTCCCTC  
GGCCAGAACCCCTCCGAGTCTGAGCTTCAGGACATGATCAACGAGGTCGACGCCGACAACAACGGCACCATC  
GACTTCCCTGGTGCGTAAAACCTTGACAAGCCTGGGCCGACGAAAACAAGACTGACACTAGCGTCAAGAGTTCC  
TTACCATGATGGCGCGCAAGATGAAGGACTGACTCCGAGGAGGAGATCCGTGAGGCTTTCAAGGTGGCA  
GGATCATGCTTCGCTGAAGCCTTGACATGCTAACTCACCGTCAGGTTTTTCGACCGTGACAACAACGGCTTCA  
TTTCTGCTGCTGAGCTCCGACACGTTATGACCTCCATCGGCGAGAAGCTTACCGATGACGAGGTTGATGAGA  
TGATCCGGGAGGCTGACCAGGACGGTGATGGCCGAATCGACTGTGAGTCTCTCCGTCACCGCTGACGAAAA  
GTTGCTAGCAAAGCTTCCAATACTGACCACGACGATAGACAACGAGTTTGTCCAACATCATGAATGGCAAAAA  
AAAAAAA

**F7**

ACTTAAACATCCATCTTGTTTTCGCCGCTTGCCCTCGCCGCGTCTTGCTAGAAAGCTGTGCGTAACTCTTTATG  
TAGGACAAGGATGGCGATGGTGAGTGATGCTCCCCTTTCCGCGATGTTTCTTCGTTGGCCCCGTGCGAAACC  
CAAAATCGATCCAACAAAGCATCAGACCCTATAACTCTTTACATCTCTTTCTATGCGATATTCTTAAATCGA  
AAACATGAGCTAAACGCCTCGCTCTAGGCCAGATTACCACCAAGGAGCTCGGTACCGTTATGCGCTCTCTCG  
GCCAGAACCCCTCCGAGTCTGAGCTTCAGGACATGATCAACGAGGTTGACGCCGACAACAACGGCACCATCG  
ACTTTCTTGGTGCGTAATATTCCAAGACGATTAGAGGACGGTCAGTACTAACCATTGGGTAAAAGAGTTCCCTC  
ACCATGATGGCGCGCAAGATGAAGGATACCGACTCTGAGGAGGAGATCCGCGAGGCTTTCAAGGTGTTTCGAC  
CGTGACAACAACGGTTTTCATTTCTGCTGCTGAGCTTCGACATGTCATGACCTCCATCGGCGAGAAGCTCACT  
GATGATGAGGTTGATGAGATGATCCGAGAGGCTGACCAGGACGGCGATGGCCGAATCGACTGTGAGTTGCTT  
GAGATTAGATATATAGTACCAACGTCCAGTTACTGACAAGACTATAGACAACGAGTTTCGTCCAACATCATGAT  
TGCAAAAAAAAAAACA

**F8**

CCTTGAGCAATCCTCTTGTTTTCGCCGCTTGCCCTCGCCGCGTCTTGCTAGAAAGCTGTGCGTAACTCTTTATG  
TAGGACAAGGATGGCGATGGTGAGTGATGCTCCCCTTTCCGCGATGTTTCTTCGTTGGCCCCGTGCGAAACC  
CAAAATCGATCCAACAAAGCATCAGACCCTATAACTCTTTACATCTCTTTCTATGCGATATTCTTAAATCGA  
AAACATGAGCTAAACGCCTCGCTCTAGGCCAGATTACCACCAAGGAGCTCGGTACCGTTATGCGCTCTCTCG  
GCCAGAACCCCTCCGAGTCTGAGCTTCAGGACATGATCAACGAGGTTGACGCCGACAACAACGGCACCATCG  
ACTTTCTTGGTGCGTAATATTCCAAGACGATTAGAGGACGGTCAGTACTAACCATTGGGTAAAAGAGTTCCCTC  
ACCATGATGGCGCGCAAGATGAAGGATACCGACTCTGAGGAGGAGATCCGCGAGGCTTTCAAGGTGTTTCGAC

CGTGACAACAACGGTTTTCATTTCTGCTGCTGAGCTTCGACATGTCATGACCTCCATCGGGCAGAGAAGCTCACT  
GATGATGAGGTTGATGAGATGATCCGAGAGGCTGACCAGGACGGCGATGGCCGAATCGACTGTGAGTTGCTT  
GAGATTAGATATATAGTACCAACGTCCAGTTACTGACAAGACTATAGACAACGAGTTCGTCCAACTCATGAT  
TGCAAAAAA

**F9**

ACCGGGAACATACGTAATTGTTTTCGCCGCTTGCCTCGCCGCGTCTTGCTAGAAAGCTGTCGCTAACCTCTTTA  
TGTAGGACAAGGATGGCGATGGTGAGTGATGCTCCCCTTTCCGCGATGTTTTCTTCGTTGGCCCCGTGCGAAA  
CCCAAATCGATCCAACAAAGCATCAGACCATAAATCTTTACATCTCTTTCTATGCGATATTCTTAAATC  
GAAAACATGAGCTAAACGCCTCGCTCTAGGCCAGATTACCACCAAGGAGCTCGGTACCGTTATGCGCTCTCT  
CGGCCAGAACCCTCCGAGTCTGAGCTTCAGGACATGATCAACGAGGTTGACGCCGACAACAACGGCACCAT  
CGACTTTCCTGGTGCGTAATATTCCAAGACGATTAGAGGACGGTCAGTACTAACCATTTGGGTAAAGAGTTCC  
TCACCATGATGGCGCGCAAGATGAAGGATACCGACTCTGAGGAGGAGATCCGCGAGGCTTTCAAGGTGTTTCG  
ACCGTGACAACAACGGTTTTCATTTCTGCTGCTGAGCTTCGACATGTCATGACCTCCATCGGGCAGAGAAGCTCA  
CTGATGATGAGGTTGATGAGATGATCCGAGAGGCTGACCAGGACGGCGATGGCCGAATCGACTGTGAGTTGC  
TTGAGATTAGATATATAGTACCAACGTCCAGTTACTGACAAGACTATAGACAACGAGTTCGTCCAACTCATG  
ATGCAAAAAAATAA

**F10**

CCTGAAACATCCTCTTGTTTTCGCCGCTTGCCTCGCCGCGTCTTGCTAGAAAGCTGTCGCTAACCTCTTTATGT  
AGGACAAGGATGGCGATGGTGAGTGATGCTCCCCTTTCCGCGATGTTTTCTTCGTTGGCCCCGTGCGAAACCC  
AAATCGATCCAACAAAGCATCAGACCATAAATCTTTACATCTCTTTCTATGCGATATTCTTAAATCGAA  
AACATGAGCTAAACGCCTCGCTCTAGGCCAGATTACCACCAAGGAGCTCGGTACCGTTATGCGCTCTCTCGG  
CCAGAACCCCTCCGAGTCTGAGCTTCAGGACATGATCAACGAGGTTGACGCCGACAACAACGGCACCATCGA  
CTTTCTGGTGCGTAATATTCCAAGACGATTAGAGGACGGTCAGTACTAACCATTTGGGTAAAGAGTTCTCA  
CCATGATGGCGCGCAAGATGAAGGATACCGACTCTGAGGAGGAGATCCGCGAGGCTTTCAAGGTGTTTCGACC  
GTGACAACAACGGTTTTCATTTCTGCTGCTGAGCTTCGACATGTCATGACCTCCATCGGGCAGAGAAGCTCACTG  
ATGATGAGGTTGATGAGATGATCCGAGAGGCTGACCAGGACGGCGATGGCCGAATCGACTGTGAGTTGCTTG  
AGATTGGATATATAGTACCAACGTCCAGTTACTGACAAGACTATAGACAACGAGTTCGTCCAACTCATGATG  
CAAAAAAAAAAAAAACA

**F11**

CCCTGGAGGTAATCCTCTTGTTTTCGCCGCTTGCCTCGCCGCGTCTTGCTAGAAAGCTGTCGCTAACCTCTTTA  
TGTAGGACAAGGATGGCGATGGTGAGTGATGCTCCCCTTTCCGCGATGTTTTCTTCGTTGGCCCCGTGCGAAA  
CCCAAATCGATCCAGCAAAGCATCAGACCATAAATCTTTACATCTCTTTCTATGCGATATTCTTAAATC  
GAAAACATGAGCTAAACGCCTCGCTCTAGGCCAGATTACCACCAAGGAGCTCGGTACCGTTATGCGCTCTCT  
CGGCCAGAACCCTCCGAGTCTGAGCTTCAGGACATGATCAACGAGGTTGACGCCGACAACAACGGCACCAT  
CGACTTTCCTGGTGCGTAATATTCCAAGACGATTAGAGGACGGTCAGTACTAACCTTTGGGTAAAGAGTTCC  
TCACCATGATGGCGCGCAAGATGAAGGATACCGACTCTGAGGAGGAGATCCGCGAGGCTTTCAAGGTGTTTCG  
ACCGTGACAACAACGGTTTTCATTTCTGCTGCTGAGCTTCGACATGTCATGACCTCCATCGGGCAGAGAAGCTCA  
CTGATGATGAGGTTGATGAGATGATCCGAGAGGCTGACCAGGACGGCGATGGCCGAATCGACTGTGAGTTGC  
TTGAGATTAGATATATAGTACCAACGTCCAGTTACTGACAAGACTATAGACAACGAGTTCGTCCAACTCATG  
ATGCAAAAAAAAAAAAA

**F12**

ACCTGGTTGAAATCCATCTTGTTTTCGCCGCTTGCCTCGCCGCGTCTTGCTAGAAAGCTGTCGCTAACCTCTT  
TATGTAGGACAAGGATGGCGATGGTGAGTGATGCTCCCCTTTCCGCGATGTTTTCTTCGTTGGCCCCGTGCGA  
AACCCAAATCGATCCAGCAAAGCATCAGACCATAAATCTTTACATCTCTTTCTATGCGATATTCTTAAA  
TCGAAAACATGAGCTAAACGCCTCGCTCTAGGCCAGATTACCACCAAGGAGCTCGGTACCGTTATGCGCTCT  
CTCGGCCAGAACCCTCCGAGTCTGAGCTTCAGGACATGATCAACGAGGTTGACGCCGACAACAACGGCACC  
ATCGACTTTCCTGGTGCGTAATATTCCAAGACGATTAGAGGACGGTCAGTACTAACCTTTGGGTAAAGAGTT  
CCTCACCATGATGGCGCGCAAGATGAAGGATACCGACTCTGAGGAGGAGATCCGCGAGGCTTTCAAGGTGTT  
CGACCGTGACAACAACGGTTTTCATTTCTGCTGCTGAGCTTCGACATGTCATGACCTCCATCGGGCAGAGAAGCT  
CACTGATGATGAGGTTGATGAGATGATCCGAGAGGCTGACCAGGACGGCGATGGCCGAATCGACTGTGAGTT

GCTTGAGATTAGATATATAGTACCAACGTCCAGTTACTGACAAGACTATAGACAACGAGTTCGTCCAACCTCA  
TGATGCAAAAAAAAAAACA

**F13**

GCGTTAGCATCCATCTTGTCTCGCCGCTTGCCTCGCCGCGTCTTGCTAGAAGCTGTCGCTAACCTCTTTATG  
TAGGACAAGGATGGCGATGGTGAGTGATGCTCCCCTTTCCGCGATGTTTCTTCGTTGGCCCCGTGCGAAACC  
CAAATCGATCCAACAAAGCATCAGACCCTATAACTCTTTACATCTCTTTCTATGCGATATTCTTAAATCGA  
AAACATGAGCTAAACGCCTCGCTCTAGGCCAGATTACCACCAAGGAGCTCGGTACCGTTATGCGCTCTCTCG  
GCCAGAACCCTCCGAGTCTGAGCTTCAGGACATGATCAACGAGGTTGACGCCGACAACAACGGCACCATCG  
ACTTTCTTGGTGCCTAATATTCCAAGACGATTAGAGGACGGTCAGTACTAACCATTTGGGTAAAAGAGTTCCCTC  
ACCATGATGGCGCGCAAGATGAAGGATACCGACTCTGAGGAGGAGATCCGCGAGGCTTTCAAGGTGTTTCGAC  
CGTGACAACAACGGTTTTCATTTCTGCTGCTGAGCTTCGACATGTCATGACCTCCATCGGCGAGAAGCTCACT  
GATGATGAGGTTGATGAGATGATCCGAGAGGCTGACCAGGACGGCGATGGCCGAATCGACTGTGAGTTGCTT  
GAGATTGGATATATAGTACCAACGTCCAGTTACTGACAAGACTATAGACAACGAGTTCGTCCAACCTCATAAT  
GCAAAAAAAAAAAAAA

**F14**

AACGCTCCTAACTTGGGTCTTCTCTATCGCTGCTCTGAGTGGCGATCTTTTGGCAAGGCTGTCGCTAAC  
CTCTTGCGTAGGACAAGGATGGCGATGGTGAGTGATTCTCCCTCCTGCTCGCAAAGCCCCTCGTCGGTCTCA  
GCCCCGATCTTTTCCCGAATTACATGATGCACCAACCTCTATGCGCACACTGCTCTTCAGTCGATGCGAAT  
CGTTTCGAGACGGTAAACTAAACGTTTCGTTCTAGGCCAGATCACCACCAAGGAGCTGGGTACCGTCATGCG  
CTCCCTCGGCCAGAACCCTCCGAGTCTGAGCTTCAGGACATGATCAACGAGGTCGACGCCGACAACAACGG  
CACCATCGACTTCCCTGGTGCCTAAAACCTTGACAAGCCTGGGCCGACGAAACAAGACTGACACTAGCGTCAA  
GAGTTCCTTACCATGATGGCGCGCAAGATGAAGGACACTGACTCCGAGGAGGAGATCCGTGAGGCTTTCAG  
GTTGGCAGGATCATGCTTCGCTGAAGCCTTGACATGCTAACTCACCGTCAGGTTTTTCGACCGTGACAACAAC  
GGCTTCATTTCTGCTGCTGAGCTCCGACACGTTATGACCTCCATCGGCCGAGAAGCTTACCGATGACGAGGTT  
GATGAGATGATCCGGGAGGCTGACCAGGACGGTGATGGCCGAATCGACTGTGAGTCTCTTCCGTCACCGCTG  
ACGAAAAGTTGCTAGCAAAGCTTCCAATACTGACCACGACGATAGACAACGAGTTTTGTCCAACCTCATGATG  
CAAAAAA

**F15**

TCTTGAGCATGCTCTTGTTCGCGCTTGCCTCGCCGCGTCTTGCTAGAAGCTGTCGCTAACCTCTTTATGT  
AGGACAAGGATGGCGATGGTGAGTGATGCTCCCCTTTCCGCGATGTTTCTTCGTTGGCCCCGTGCGAAACCC  
AAATCGATCCAACAAAGCATCAGACCCTATAACTCTTTACATCTCTTTCTATGCGATATTCTTAAATCGAA  
AACATGAGCTAAACGCCTCGCTCTAGGCCAGATTACCACCAAGGAGCTCGGTACCGTTATGCGCTCTCTCGG  
CCAGAACCCTCCGAGTCTGAGCTTCAGGACATGATCAACGAGGTTGACGCCGACAACAACGGCACCATCGA  
CTTTCTTGGTGCCTAATATTCCAAGACGATTAGAGGACGGTCAGTACTAACCATTTGGGTAAAAGAGTTCCCTCA  
CCATGATGGCGCGCAAGATGAAGGATACCGACTCTGAGGAGGAGATCCGCGAGGCTTTCAAGGTGTTTCGACC  
GTGACAACAACGGTTTTCATTTCTGCTGCTGAGCTTCGACATGTCATGACCTCCATCGGCGAGAAGCTCACTG  
ATGATGAGGTTGATGAGATGATCCGAGAGGCTGACCAGGACGGCGATGGCCGAATCGACTGTGAGTTGCTTG  
AGATTAGATATATAGTACCAACGTCCAGTTACTGACAAGACTATAGACAACGAGTTCGTCCAACCTACAATA  
GGCAAAAAAAAAAAAAA

**F16**

CCTTTAGCATACATCTTGTTCGCGCTTGCCTCGCCGCGTCTTGCTAGAAGCTGTCGCTAACCTCTTTATG  
TAGGACAAGGATGGCGATGGTGAGTGATGCTCCCCTTTCCGCGATGTTTCTTCGTTGGCCCCGTGCGAAACC  
CAAATCGATCCAACAAAGCATCAGACCCTATAACTCTTTACATCTCTTTCTATGCGATATTCTTAAATCGA  
AAACATGAGCTAAACGCCTCGCTCTAGGCCAGATTACCACCAAGGAGCTCGGTACCGTTATGCGCTCTCTCG  
GCCAGAACCCTCCGAGTCTGAGCTTCAGGACATGATCAACGAGGTTGACGCCGACAACAACGGCACCATCG  
ACTTTCTTGGTGCCTAATATTCCAAGACGATTAGAGGACGGTCAGTACTAACCATTTGGGTAAAAGAGTTCCCTC  
ACCATGATGGCGCGCAAGATGAAGGATACCGACTCTGAGGAGGAGATCCGCGAGGCTTTCAAGGTGTTTCGAC  
CGTGACAACAACGGTTTTCATTTCTGCTGCTGAGCTTCGACATGTCATGACCTCCATCGGCGAGAAGCTCACT  
GATGATGAGGTTGATGAGATGATCCGAGAGGCTGACCAGGACGGCGATGGCCGAATCGACTGTGAGTTGCTT

GAGATTAGATATATAGTACCAACGTCCAGTTACTGACAAGACTATAGACAACGAGTTCGTCCAACCTCATAAT  
TGCAAAAAAAAAAAAAAAAA

**F17**

GCATGACATCCGTCTTGTTCGCCGCTTGCCTCGCCGCGTCTTGCTAGAAGCTGTGCGCTAACCTCTTTATGT  
AGGACAAGGATGGCGATGGTGAGTGATGCTCCCCTTTCCGCGATGTTTCTTCGTTGGCCCCGTGCGAAACCC  
AAATCGATCCAGCAAAGCATCAGACCCTATAACTCTTTACATCTCTTTCTATGCGATATTCTTAAATCGAA  
AACATGAGCTAAACGCCTCGCTCTAGGCCAGATTACCACCAAGGAGCTCGGTACCGTTATGCGCTCTCTCGG  
CCAGAACCCCTCCGAGTCTGAGCTTCAGGACATGATCAACGAGGTTGACGCCGACAACAACGGCACCATCGA  
CTTTCTGGTGCFTAATATTCCAAGACGATTAGAGGACGGTCAGTACTAACCATTGGGTAAAGAGTTCCTCA  
CCATGATGGCGCGCAAGATGAAGGATACCGACTCTGAGGAGGAGATCCGCGAGGCTTTCAAGGTGTTGACC  
GTGACAACAACGGTTTCATTTCTGCTGCTGAGCTTCGACATGTCATGACCTCCATCGGCGAGAAGCTCACTG  
ATGATGAGGTTGATGAGATGATCCGAGAGGCTGACCAGGACGGCGATGGCCGAATCGACTGTGAGTTGCTTG  
AGATTAGATATATAGTACCAACGTCCAGTTACTGACAAGACTATAGACAACGAGTTCGTCCAACCTCTAAATG  
CAAAAAAAAAAAAAAAAA

**F18**

TCTGTATCATCTCTTGTTCGCCGCTTGCCTCGCCGCGTCTTGCTAGAAGCTGTGCGCTAACCTCTTTATGTA  
GGACAAGGATGGCGATGGTGAGTGATGCTCCCCTTTCCGCGATGTTTCTTCGTTGGCCCCGTGCGAAACCCA  
AATCGATCCAACAAAGCATCAGACCCTATAACTCTTTACATCTCTTTCTATGCGATATTCTTAAATCGAAA  
ACATGAGCTAAACGCCTCGCTCTAGGCCAGATTACTACCAAGGAGCTCGGTACCGTTATGCGCTCTCTCGGC  
CAGAACCCCTCCGAGTCTGAGCTTCAGGACATGATCAACGAGGTTGACGCCGACAACAACGGCACCATCGAC  
TTTCTGGTGCFTAATATTCCAAGACGATTAGAGGACGGTCAGTACTAACCATTGGGTAAAGAGTTCCTCAC  
CATGATGGCGCGCAAGATGAAGGATACCGACTCTGAGGAGGAGATCCGCGAGGCTTTCAAGGTGTTGACCCG  
TGACAACAACGGTTTCATTTCTGCTGCTGAGCTTCGACATGTCATGACCTCCATCGGCGAGAAGCTCACTGA  
TGATGAGGTTGATGAGATGATCCGAGAGGCTGACCAGGACGGCGATGGCCGAATCGACTGTGAGTTGCTTGA  
GATTAGATATATAGTACCAACGTCCAGTTACTGACAAGACTATAGACAACGAGTTCGTCCAACCTCTGAATGG  
CAAAAAAAGCAAAA

**F19**

CAAAATCGATTGCTGTGCTCTCTTCTGTGCTCTGAATGGCGATCTTTTGGCAAGGCTGTGCGCTAACCTCTTGC  
GTAGGACAAGGATGGCGATGGTGAGTGATTCTCCCTCCTGCTCGCAAAGCCCCCTCGTCGGTCTCAGCCCGAT  
TCTTTTCCCGAATTACATGATGCACCAAACCTCTATGCGCACACTGCTCTTCAGTCGATGCGAATCGTTTCG  
AGACGGTAAACTAAACGTTTCGTTCTAGGCCAGATCACCACCAAGGAGCTGGGTACCGTCATGCGCTCCCTC  
GGCCAGAACCCCTCCGAGTCTGAGCTTCAGGACATGATCAACGAGGTCGACGCCGACAACAACGGCACCATC  
GACTTCCCTGGTGCFTAAACTTGACAAGCCTGGGCCGACGAAACAAGACTGACACTAGCGTCAAGAGTTCC  
TTACCATGATGGCGCGCAAGATGAAGGACACTGACTCCGAGGAGGAGATCCGTGAGGCTTTCAAGGTTGGCA  
GGATCATGCTTCGCTGAAGCCTTGACATGCTAACTCACCGTCAGGTTTTTCGACCGTGACAACAACGGCTTCA  
TTTCTGCTGCTGAGCTCCGACACGTTATGACCTCCATCGGCGAGAAGCTTACCGATGACGAGGTTGATGAGA  
TGATCCGGGAGGCTGACCAGGACGGTGATGGCCGAATCGACTGTGAGTCTCTTCCGTCACCGCTGACGAAAA  
GTTGCTAGCAAAGCTTCCAATACTGACCACGACGATAGACAACGAGTTTGTCCAACCTCATGATGCAAAAAA  
AAAAAAA