



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN  
NICOLÁS DE HIDALGO**

---

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
AGROPECUARIAS Y FORESTALES**

**ÁREA TEMÁTICA  
INTERACCIÓN PLANTA-MICROORGANISMO-INSECTO**

**CARACTERIZACIÓN DE AISLAMIENTOS DE  
*Fusarium* spp. ASOCIADOS CON MALFORMACIÓN  
DE MANGO EN MICHOACÁN**

**TESIS**

**QUE PRESENTA  
ING. AGRO. TERESITA DEL CARMEN ÁVILA VAL**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**DIRECTOR DE TESIS:  
DR. GERARDO RODRÍGUEZ ALVARADO  
CO-DIRECTOR DE TESIS:  
DRA. MARTHA ELENA PEDRAZA SANTOS**

**Morelia, Mich. Julio de 2009**





# UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Programa Institucional de Maestría en  
Ciencias Biológicas

Área Temática  
Interacción Planta - Microorganismo - Insecto

Caracterización de aislamientos de  
*Fusarium* spp, asociados con malformación  
de mango en Michoacán

## TESIS

Teresita del Carmen Ávila Val

Director de Tesis: Dr. Gerardo Rodríguez Alvarado  
Co-Director de Tesis: Dra. Martha Elena Pedraza Santos

Morelia, Michoacán Julio de 2009



INSTITUTO DE  
INVESTIGACIONES  
AGROPECUARIAS  
Y FORESTALES



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

DR. DANIEL VAL ARREOLA  
COORDINADOR GENERAL DEL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
P R E S E N T E

Por este conducto nos permitimos comunicarle que después de haber revisado el manuscrito final de la Tesis Titulada: "Caracterización de aislamientos de *Fusarium* spp, asociados con malformación de mango en Michoacán" presentado por la ING. TERESITA DEL CARMEN ÁVILA VAL, consideramos que reúne los requisitos suficientes para ser publicado y defendido en Examen de Grado de Maestra en Ciencias.

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

ATENTAMENTE

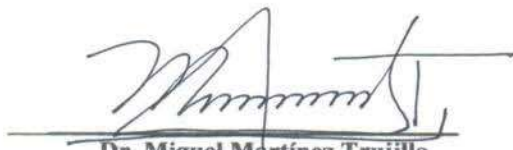
Morelia, Michoacán, 9 de julio de 2009

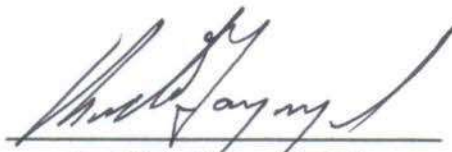
MIEMBROS DE LA COMISIÓN REVISORA

  
Dr. Gerardo Rodríguez Alvarado

  
Dra. Martha Elena Pedraza Santos

  
Dr. Sylvia Patricia Fernández Pavía

  
Dr. Miguel Martínez Trujillo

  
Dr. Héctor Lozoya Saldaña

## **DEDICATORIA**

### **A mis padres, Arturo Ávila Pardo y María Virginia Val Valencia**

Con profunda admiración y cariño, porque me han guiado con amor y ejemplo, sin escatimar esfuerzo alguno.

### **A mi esposo José Luis Hernández Cortés y mis hijos José Luis y Mariana**

Quienes han llenado mi vida de amor, alegría y comprensión; son mi fortaleza y fuente de motivación para la realización de todo proyecto anhelado.

### **A mis hermanos, María Virginia, Arturo y Gisela**

De quienes he aprendido tanto en este caminar por la vida juntos, apoyándonos y compartiendo siempre todo, por todas las alegrías vividas.

### **A mis suegros, José Luis Hernández Mora e I. Eugenia Cortés Silva**

Por confiar en mi persona y recibirme en su familia.

### **A mis cuñados, Fernando A., Fernando R., Juan Carlos y Sabrina, María Eugenia, Alicia, Laura y Jorge, Patricia, María de los Ángeles y Felipe, Miguel Ángel y Divia**

### **A mis sobrinos, María Virginia, Fernanda, Marcela, Juan Carlos, Luis Enrique, Sabrina, Elisa, Carlos y Marizabel**

Por llenarnos de júbilo y su cariño incondicional.

### **A mis amigos**

Que son parte integral de mi familia.

**Que Dios los bendiga.**

## AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por darme la oportunidad de existir y formar parte de una familia maravillosa que me ampara siempre.

A la **Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo**, y en especial a la **Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”** por todos los conocimientos transmitidos en mi formación profesional.

Al **Instituto de Investigaciones Agrícolas y Forestales (IIAF)** por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría.

Al **Programa de Becas del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, (CONACYT)** por proporcionarme el apoyo económico para la realización de mis estudios de maestría.

A los integrantes de mi **Comisión Revisora, Dr. Gerardo Rodríguez Alvarado, Dra. Martha Elena Pedraza Santos, Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavia, Dr. Miguel Martínez Trujillo y Dr. Héctor Lozoya Saldaña** a quienes debo esta oportunidad, por su invaluable asesoría, respaldo y cálida amistad.

Al **Dr. Juan Carlos Montero Castro** por su generoso apoyo y consejos durante mis estudios y en la realización de este trabajo.

A mis **compañeros:**

- del laboratorio de **Patología Vegetal, Edith Garay, Marlene Díaz y Carmen Quezada** por su cariño y ayuda.
- de maestría, sobre todo a **Patricia Batista y Nuria Gómez**, por su amistad y los gratos momentos que tuvimos.
- de la **Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”** por las innumerables aventuras y experiencias que hemos compartido.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

	<b>Página</b>
ÍNDICE DE CUADROS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS .....	ii
ÍNDICE DE CUADROS DEL APÉNDICE.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS DEL APÉNDICE.....	vi
RESUMEN.....	viii
SUMMARY.....	x
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 Cultivo del mango.....	3
2.2 Enfermedades del cultivo.....	4
2.3 Malformación o "Escoba de bruja".....	5
2.3.1 Agente causal de la enfermedad.....	6
2.4 Morfología de <i>Fusarium</i> .....	8
2.4.1 Micelio.....	9
2.4.2 Macroconidios.....	9
2.4.3 Microconidios.....	9
2.4.4 Clamidosporas.....	10
2.4.5 Otros caracteres.....	11
2.4.6 Caracteres secundarios.....	11
2.5 Relación taxonómica y criterios de identificación de las especies de <i>Fusarium</i> involucradas en la malformación de mango.....	11
2.5.1. Especies de <i>Fusarium</i> asociadas a la malformación de mango	13
2.5.1.1 <i>Fusarium mangiferae</i> Britz, Wingfield & Marasas.....	14
2.5.1.2 <i>Fusarium sterilihyphosum</i> Britz, Marasas & Wingfield...	14
2.5.1.3 <i>Fusarium oxysporum</i> .....	15
2.6 Construcción de árboles filogenéticos.....	16
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
3.1 Descripción de los sitios de muestreo y colecta del material enfermo	18

3.2 Preparación de Medios de cultivo.....	20
3.2.1 Medio Papa Dextrosa Agar 1X (1X PDA).....	20
3.2.2 Medio Papa Dextrosa Agar 1/2X (1/2X PDA).....	20
3.2.3 Medio Agar Agua 2 % (AA).....	20
3.2.4 Medio Agar Agua Hojas de Clavel (CLA).....	20
3.2.5 Medio Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA).....	21
3.3 Obtención de aislamientos de <i>Fusarium</i> .....	21
3.3.1 Siembra del tejido malformado.....	21
3.3.2 Cultivos monospóricos y preservación de los aislamientos de <i>Fusarium</i> .....	21
3.4 Caracterización cultural y morfológica de los aislamientos de <i>Fusarium</i> .....	22
3.4.1 Características culturales en medio 1X PDA.....	22
3.4.2 Características morfológicas en medio CLA.....	22
3.4.3 Tasa de crecimiento medio 1X PDA .....	23
3.5 Extracción de ácidos nucleicos.....	23
3.6 Amplificación de ADN por PCR para estudios filogenéticos y taxonómicos.....	23
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
4.1 Obtención de aislamientos de <i>Fusarium</i> .....	26
4.2 Caracterización cultural y morfológica de los aislamientos de <i>Fusarium</i> .....	26
4.2.1 Características culturales en medio 1X PDA.....	26
4.2.2 Características morfológicas en medio de cultivo CLA.....	33
4.3 Tasa de crecimiento micelial en 1X PDA.....	38
4.4 Análisis filogenéticos y taxonómicos.....	39
V. CONCLUSIONES.....	48
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
VII. APÉNDICE.....	55



## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Accesiones del Centro Nacional de Información Biotecnológica de las especies de <i>Fusarium</i> asociadas a la malformación de mango.....	25
2	Aislamientos de <i>Fusarium</i> obtenidos de tejidos malformados de mango seleccionados para la caracterización morfológica y cultural.....	27
3	Características culturales en medio de cultivo PDA de aislamientos de <i>Fusarium</i> obtenidos de tejidos malformados de mango.....	31
4	Tamaño de los macroconidios y microconidios de <i>Fusarium</i> obtenidos de tejido con malformación en Michoacán como resultado del municipio de su procedencia.....	35
5	Concentrado de las características fenotípicas de <i>Fusarium</i> spp	36



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Síntomas de la malformación de mango en árboles de la variedad Haden en el estado de Michoacán. (A) Tejidos vegetativos; (B) Tejidos florales.....	6
2	Ubicación geográfica de los municipios de Michoacán de donde se colectaron las muestras de mango con malformación vegetativa y floral .....	18
3	Aislamientos de <i>Fusarium</i> spp desarrollados en medio de cultivo PDA vistas por anverso y reverso. Del 1 al 15 Taretan, 16 y 19 Coalcomán, 22 Tepalcatepec.....	28
4	Aislamientos de <i>Fusarium</i> spp desarrollados en medio de cultivo PDA vistas por anverso y reverso. Del 24 al 38 Tepalcatepec, 41 a 48 Apatzingán.....	29
5	Aislamientos de <i>Fusarium</i> spp desarrollados en medio de cultivo PDA vistas por anverso y reverso. El 50 y 52 Apatzingán, 53 a 72 Gabriel Zamora.....	30
6	Morfología del aislamiento No.1. (A) Hifa enrollada; (B). Forma típica de los macroconidios; (C) Microconidios en falsas cabezas.....	33

7	Gel representativo de la amplificación por PCR de los fragmentos de ADN del factor de elongación, histona y $\beta$ -Tubulina de los cultivos 46, 50, 19, 01, 07, 02, 53, 41 y 72 de <i>Fusarium</i> aislados de tejidos malformados vegetativos y florales de mango en Michoacán.....	39
8	Consenso de mayoría de cuatro árboles más parsimoniosos derivados del análisis de la combinación de las secuencias de los genes del Factor de Elongación y beta-Tubulina. Líneas sin coincidir indican clados sin resolver en el consenso estricto. NRRL National Center for Agricultural Utilization Research, Peoria, Illinois USA. CML Colecao Micológica de Lavras, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil.....	44
9	Consenso de mayoría de cinco árboles más parsimoniosos derivados del análisis de la combinación de las secuencias de los genes de Histona y beta-Tubulina. NRRL, National Center for Agricultural Utilization Research, Peoria, Illinois USA. MRC, Culture collection of the Medical Research Council, Tygerberg, South Africa.....	45

## ÍNDICE DE CUADROS DEL APÉNDICE

Cuadro		Página
1A	Datos de colecta de tejido malformado de mango obtenidos en cinco municipios de Michoacán con alta incidencia en la enfermedad.....	55
2A	Coordenadas de las huertas de donde se colectó el material con malformación vegetativa y floral en mango.....	57
3A	Características morfológicas de macroconidios en medio de cultivo CLA (Hojas de clavel-agar).....	58
4A	Características morfológicas de microconidios en medio de cultivo CLA (Hojas de clavel-agar).....	59
5A	Tasa de crecimiento micelial de <i>Fusarium</i> spp a 25 °C por 72 h en medio PDA .....	60
6A	Análisis de varianza para el efecto del municipio sobre el largo del macroconidio de <i>Fusarium</i> spp.....	61
7A	Análisis de varianza para el efecto crecimiento de <i>Fusarium</i> spp.....	61
8A	Posición de los cambios en las bases en las secuencias del gen del factor de elongación de los aislamientos obtenidos de tejido malformado de mango... ..	62

9A	Posición de los cambios en las bases en las secuencias del gen de histona de los aislamientos obtenidos de tejido malformado de mango... ..	65
10A	Posición de los cambios en las bases en las secuencias del gen de $\beta$ -tubulina de los aislamientos obtenidos de tejido malformado de mango.....	66
11A	Resultados de los análisis de Máxima Parsimonia, Máxima Verosimilitud y Bayesiano practicados a las secuencias de los genes estudiados y sus combinaciones.....	68

## ÍNDICE DE FIGURAS DEL APÉNDICE

Figura		Página
1A	Consenso de mayoría de 6258457 árboles más parsimoniosos derivados del análisis de las secuencias del gen del factor de elongación. NRRL, National Center for Agricultural Utilization Research, Peoria, Illinois USA. CML Colecao Micológica de Lavras, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil...	69
2A	Consenso de mayoría de 5816 árboles más parsimoniosos derivados del análisis de las secuencias del gen de Histona. MRC, Culture collection of the Medical Research Council, Tygerberg, South Africa.....	70
3A	Consenso de mayoría de 450 árboles más parsimoniosos derivados del análisis de las secuencias del gen beta-Tubulina. NRRL, National Center for Agricultural Utilization Research, Peoria, Illinois USA. MRC, Culture collection of the Medical Research Council, Tygerberg, South Africa. CML Colecao Micológica de Lavras, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil.....	71
4A	Consenso de mayoría de 6995721 árboles más parsimoniosos derivados del análisis de la combinación de las secuencias de los genes del factor de elongación e Histona. NRRL, National Center for Agricultural Utilization Research, Peoria, Illinois USA. CML Colecao Micológica de Lavras, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil.....	72

5A	Consenso de mayoría de 7793471 árboles más parsimoniosos derivados del análisis de la combinación de las secuencias de los genes del factor de elongación, histona y beta-Tubulina. NRRL, National Center for Agricultural Utilization Research, Peoria, Illinois USA. CML Colecao Micológica de Lavras, Univ. Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil.....	73
----	---	----

## RESUMEN

La enfermedad denominada malformación o “escoba de bruja” del mango es considerada como el factor fitosanitario más importante de este cultivo en Michoacán. Se han descrito varias especies de *Fusarium* como causantes de esta afección en el ámbito mundial; sin embargo, aún se desconoce la identidad precisa de las especies de este hongo que pudieran estar involucradas con este trastorno en México. El objetivo principal de esta investigación fue identificar y caracterizar aislamientos de *Fusarium* asociados con tejidos malformados de mango en Michoacán. Se realizaron colectas en cinco municipios del estado con alta incidencia de la enfermedad. Se obtuvieron aislamientos del hongo *Fusarium* en medio ½X PDA de muestras con malformación floral y vegetativa. Las colonias fungosas obtenidas presentaron micelio abundante y algodonoso, con variación en color desde rosa hasta café violáceo, con numerosos macroconidios en forma de canoa con tres a cinco células. Asimismo, se observaron microconidios ovoides, la mayoría unicelulares, dispuestos en falsas cabezas en mono y polifiálides. No presentaron esporodoquios, ni clamidosporas, pero si se observaron hifas enrolladas en la mayoría de los aislamientos. El rango de tamaño de los macroconidios fue en promedio de 24 a 80 µm por 2.4 a 5.52 µm, mientras que en los microconidios fue de 6 a 16.8 µm por 2.4 a 4.08 µm. La tasa de crecimiento micelial mostró un rango de 6.94 mm a 10.78 mm a las 24 horas.

Los aislamientos de *Fusarium* spp obtenidos se compararon con cepas de *Fusarium* asociadas a la malformación en mango en Brasil, Estados Unidos, India, Israel y Sudáfrica mediante el análisis de las secuencias parciales de los genes histona, β-Tubulina y factor de elongación. Análisis individuales de las secuencias y en combinaciones de éstas para Máxima Parsimonia, Máxima Verosimilitud y Bayesiano se usaron para delimitar las especies y estimar las relaciones genéticas y filogenéticas entre los aislamientos. Al analizar los dendogramas obtenidos se observó que la mayoría de los aislamientos de Michoacán forman un grupo compacto



distribuido en dos clados que se distancian filogenéticamente de las cepas de *F. oxysporum* y *F. mangiferae*. Sin embargo, estas diferencias no fueron tan evidentes para todos los aislamientos estudiados al compararlos con *F. sterilihyphosum* y *Fusarium* spp de Brasil, con quienes comparten semejanzas en sus secuencias y por lo general fueron agrupados como conglomerados parafiléticos de estas especies. Los aislamientos del municipio de Coalcomán fueron las más parecidas genéticamente a las cepas MRC2802 y CML283 identificadas como *F. sterilihyphosum*. Los resultados obtenidos sugieren que en Michoacán se encuentra presente un nuevo taxón de *Fusarium* asociado a la malformación en mango.

## SUMMARY

Mango malformation is the main disease affecting this fruit crop worldwide. Several taxa of *Fusarium* have been associated with the disease; however, the identity of the *Fusarium* species present in Mexico is unknown. The objective of this research was to identify and characterize *Fusarium* isolates associated with mango malformation in Michoacán, México. Samples were obtained from mango orchards with high disease incidence in five counties. *Fusarium* isolates were recovered in ½X PDA from floral and vegetative malformation tissues. Fungus colonies showed cottony mycelium with great variation in color, from pink to purple-brown, numerous macroconidia with typically canoe-shaped form and several cells (three to five septate), measuring from 24-80 µm in length to 2.4-5.52 µm width. Microconidia were ovoid, one-celled, produced in false heads in mono- and polyphialides, measuring from 6-16.8 µm in length to 2.4-4.08 µm width. Sporodochia and chlamydospores were absent. Coiled hyphae were observed in aerial mycelium in most of the isolates. Colonies on PDA presented an average growth rate of 6.94 mm to 10.78 mm per day at 25° C.

Partial DNA sequences of the genes encoding histone, β-tubulin and translation elongation factor were obtained for several *Fusarium* isolates from Michoacán. These sequences were analyzed and compared to sequences of worldwide *Fusarium* species pathogenic to mango, with the purpose of delimiting species and estimate the phylogenetic relatedness of the Michoacán isolates. The resulting aligned datasets were analyzed separately as well as combined. Parsimony, Maximum likelihood and Bayesian analyses were performed. Results of the DNA analysis indicated that most of the Michoacán isolates formed a unique cluster with two clades; this cluster was phylogenetically distant of *F. oxysporum* and *F. mangiferae*. However, *F. sterilihyphosum* and *Fusarium* spp from Brazil were resolved as paraphyletic with Michoacán isolated. Isolates from Coalcomán were the most similar to isolates MRC2802 and CML283 of *F. sterilihyphosum*. The results

form this research suggest that a new *Fusarium* taxon associated with mango malformation is present in Michoacán

.

## I. INTRODUCCIÓN

El mango (*Mangifera indica* L.) es un cultivo frutícola de gran importancia. A nivel mundial, México ocupó el tercer lugar en producción con 1,503,010 toneladas durante el año 2005 (FAOSTAT, 2005), mientras que el estado de Michoacán ocupó el tercer lugar a nivel nacional en superficie cosechada con 21,325 hectáreas, y el segundo lugar en producción con 126,934 toneladas (SAGARPA, 2006). Se estima que 86 % de la producción nacional se consume internamente, como fruta fresca o industrializada, mientras que el 14 % restante se exporta (Chávez *et al.*, 2001).

Michoacán ocupa uno de los primeros lugares en México en superficie plantada con mango; sin embargo, se obtienen rendimientos promedio de aproximadamente 6 t ha<sup>-1</sup>, mientras que en Guerrero, estado que es el principal productor de mango, se obtiene un promedio de 10.7 t ha<sup>-1</sup> (SAGARPA, 2006). Los factores que podrían influir en la obtención de rendimientos tan bajos en Michoacán son; la falta de desarrollo y aplicación de tecnologías modernas en las huertas, y la presencia de diversas enfermedades como la cenicilla (*Oidium mangiferae*), la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporoides*), y la malformación o “escoba de bruja” (*Fusarium* spp.). Esta última enfermedad es considerada como el factor limitante fitosanitario más importante del cultivo del mango en Michoacán. Se estima que ocasiona reducciones en la producción de entre 40 y 50 % en el estado (Vega y Miranda, 1993).

La malformación del mango ocurre en la mayoría de las regiones productoras de éste cultivo en el mundo; hay reportes de su presencia en América Central, Brasil, Estados Unidos, India, Israel, Pakistán, Sudáfrica y países del Medio Oriente (Kumar y Beniwal, 1992). Se considera que ésta es la enfermedad más importante del mango en el ámbito mundial (Kumar *et al.*, 1993). Aun cuando se han reportado numerosos estudios sobre la enfermedad, se desconocen muchos aspectos sobre su biología y control (Kumar *et al.*, 1993).

La enfermedad se caracteriza por el desarrollo de deformaciones en los brotes florales (panículas) y en los brotes vegetativos. En la malformación vegetativa ocurre una pérdida de la dominancia apical y engrosamiento de las yemas vegetativas axilares o apicales. Los brotes afectados producen hojas muy pequeñas. La malformación floral incrementa el número de flores masculinas en la inflorescencia, y las flores hermafroditas que se producen son estériles o si se fertilizan abortan posteriormente (Ploetz, 2003).

### **Objetivo General**

Identificar y caracterizar genética y morfológicamente aislamientos de *Fusarium* asociados con tejidos malformados de mango de huertas en Michoacán.

### **Objetivos específicos**

1. Caracterizar morfológicamente los aislamientos de *Fusarium* obtenidos de tejidos malformados de mango presentes en municipios de Michoacán con alta incidencia de la enfermedad.
2. Determinar la diversidad genética entre los distintos aislamientos de *Fusarium* mediante el análisis de secuencias amplificadas de los genes histona H3, de la  $\beta$ -tubulina y del factor de elongación 1-  $\alpha$ .

### **Hipótesis**

Los aislamientos de *Fusarium* obtenidos de tejidos malformados de árboles de mango en Michoacán presentan diversidad genética y morfológica.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Cultivo del mango

El mango (*Mangifera indica* L.) es una especie originaria de los bosques bajos del este de la India, Bangladesh y Myanmar (Burma) entre los 16° y 28° de latitud norte, en donde se cultiva desde hace 4,000 años; este frutal ha sido ampliamente cultivado y naturalizado y su distribución se puede considerar como pantropical (Parrotta, 1993). Los principales países productores son Brasil, Filipinas, India, Indonesia, México y Pakistán.

El mango es un árbol siempre verde, erecto y bien ramificado con una densa copa, de forma oval, alargada o como cúpula, que puede empezar a producir a los cuatro o cinco años de edad, aunque su capacidad productiva plena se alcanza entre los 20 y 40 años de edad,. Los árboles de mango pueden vivir más de 100 años (Parrotta, 1993; Chávez *et al.*, 2001).

El sistema radicular del mango se compone de una raíz pivotante que penetra profundamente y un extenso sistema de raíces laterales. En su madurez, los árboles crecen a una altura típica de 25 m o más, con troncos principales de hasta 15 m. El tronco tiene una corteza gruesa, gris oscura y con fisuras y con látex resinoso (Parrotta, 1993; Chávez *et al.*, 2001).

El árbol de mango presenta hojas alternas, simples, coriáceas, de lanceoladas a oblongas, de 15 a 40 cm de largo y de 2 a 10 cm de ancho y dispuestas en espiral, las cuales brotan en racimos rojizos que inicialmente cuelgan y posteriormente toman una posición más horizontal y se tornan de color verde oscuro. Las hojas pueden permanecer en el árbol de uno a tres años. Pueden presentarse de dos a cinco brotes de hojas al año, en función del clima. La nervadura central es prominente, con un promedio de 30 pares de venas laterales. Los estomas se encuentran presentes en ambos lados de la hoja, pero principalmente en el envés. El pecíolo está

engrosado en la base y mide de 2 a 10 cm de largo (Chávez *et al.*, 2001).

Las inflorescencias terminales forman panículas de 15 a 60 cm de largo, contienen de 1,000 hasta 6,000 flores pequeñas con pedúnculo corto y presentan flores masculinas y hermafroditas. Cada flor consiste de un cáliz amarillo verdusco con lóbulos muy marcados y de 1.5 mm de largo; cinco pétalos extendidos de tres a cuatro mm de largo, de un color que va de rojo-rosado a blanco; cinco estambres; de los cuales uno o dos son fértiles y de mayor tamaño, en flores bisexuales, un pistilo con un ovario de una sola célula y un estilo delgado lateral (Parrotta, 1993; Chávez *et al.*, 2001).

El fruto es una drupa con pulpa anaranjada, gruesa y jugosa y una sola semilla, aromática y de forma elíptica, maduran de 2 a 4 meses después de la florescencia, de acuerdo a la variedad y la localidad. La semilla posee una cubierta doble de capas papiráceas, en su interior se encuentran dos cotiledones carnosos y uno o varios embriones. Los cultivares monoembrionicos contienen un embrión cigótico o sexual, mientras que los cultivares poliembriónicos contienen dos o más, de los cuales uno es cigótico y los otros nucleares (Chávez *et al.*, 2001).

## 2.2 Enfermedades del cultivo

La producción del cultivo del mango se ve afectada por diversos factores, como son las condiciones climáticas, edáficas, variedades utilizadas, deficiencias nutricionales y presencia de plagas y enfermedades. Las principales enfermedades que atacan a este cultivo son de origen fungoso, como la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*), mancha negra o pudrición por *Alternaria*, mildiu pulverulento (*Oidium mangiferae*), y malformación o “escoba de bruja” (*Fusarium* spp.). De tipo bacteriano se encuentra la mancha negra (*Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*) (Ploetz, 2003).



### **2.3 Malformación o “Escoba de bruja”**

Es una de las enfermedades más importantes que afectan al mango (Kumar y Beniwal, 1992). La enfermedad se caracteriza por el desarrollo de malformaciones en los brotes florales (panículas) y en los brotes vegetativos. El término malformación se refiere a un crecimiento anormal de brotes florales y vegetativos en las plantas afectadas. Cuando la malformación afecta las panículas, la producción de frutos puede verse seriamente afectada hasta en 80 % (Ginai, 1965 citado por Ploetz, 2003).

La malformación se reportó en India por primera vez en 1891 (Watt, 1981 citado por Ploetz, 2003), y es ahora reconocida en América Central, Brasil, Egipto, Florida (USA), Israel, Malasia, México, Pakistán, Sudáfrica, Sudán y Uganda (Crookes y Rijkenberg, 1985; Lim y Koo, 1985; citados por Ploetz, 2003; Kumar y Beniwal, 1992; Ploetz y Prakash, 1997).

En la malformación vegetativa ocurre una pérdida de la dominancia apical y engrosamiento de las yemas vegetativas axilares o apicales. Los brotes afectados producen hojas muy pequeñas, torcidas y delgadas; que dan como resultado un racimo compacto. Las plántulas muy jóvenes que desarrollan síntomas severos de engrosamiento en el ápice, permanecen achaparradas y mueren. En árboles, las ramas con malformación vegetativa no producen inflorescencias o las producen en cantidades reducidas y malformadas. Si todas las yemas de la planta son afectadas se impide el crecimiento de la misma (Ploetz, 2003).

Las yemas axilares en las inflorescencias son cortas, gruesas y altamente ramificadas. La malformación floral incrementa hasta en tres veces el total de sus flores y éstas son usualmente más largas que las normales; la mayoría son flores masculinas y las flores hermafroditas que son producidas son estériles o si se fertilizan abortan posteriormente. De manera general se produce un número anormal de flores que saturan los ejes hipertrofiados de la panícula. Las panículas deformes

son de color verde, y la sobreproducción y agrandamiento de sus brotes florales incrementan su peso.



**Fig. 1. Síntomas de la malformación de mango en árboles de la variedad Haden en el estado de Michoacán. (A) Tejidos vegetativos; (B) Tejidos florales.**

El grado de infección varía de árbol a árbol y de rama a rama en un árbol. También se pueden presentar diversos grados de severidad en la sintomatología de las inflorescencias malformadas. Además, en algunos casos es posible observar inflorescencias sanas y malformadas en el mismo brote (Ploetz, 2003).

### **2.3.1 Agente causal de la enfermedad**

La etiología de la malformación en mango ha generado controversia por muchos años (Kumar y Beniwal, 1992), se han considerado diferentes agentes causales entre los que destacan los ácaros y los hongos. Se ha detectado una alta correlación entre las poblaciones del ácaro *Aceria mangiferae* en las yemas del mango y la incidencia de tejidos malformados en los árboles estudiados

(Narasimhan, 1954; Sternlicht y Goldenberg, 1976; Noriega *et al.*, 1988; Kumar *et al.*, 1993; Mora-Aguilera *et al.*, 2003). Además, se ha informado que la aplicación de acaricidas reduce la severidad de la enfermedad (Kumar *et al.*, 1993; Noriega *et al.*, 1999).

Por otra parte, existe evidencia que indica que *A. mangiferae* no está involucrado directamente en la aparición de los síntomas de malformación en mango, (Bindra y Bakheta, 1971; Covarrubias, 1978; Kumar y Beniwal, 1992; Vega y Miranda, 1993). Lo anterior ocurre en Australia, en donde a pesar de existir una abundancia del ácaro, los árboles de mango de ese país están libres de dicha enfermedad (Ploetz y Prakash, 1997).

Por lo anterior, algunos autores han sugerido que los ácaros no son el agente causal de la malformación del mango, sino que podrían actuar como vectores al transportar sobre su cuerpo las esporas del hongo responsable de la enfermedad, y así ayudar indirectamente en el proceso de infección (Wahba *et al.*, 1986; Pinkas y Gazit, 1992); sin embargo, la evidencia de ácaros transportando esporas de *Fusarium* sobre sus cuerpos ha sido previamente reportada (Raychauduri, 1992; Noriega, 1996). Noriega (1996) sembró en un medio nutritivo ácaros colectados de yemas de mango y detectó que un 40 % de los ácaros analizados estaban infestados con el hongo. Lo anterior sugiere que ocurre un transporte directo del hongo a las yemas por los ácaros; sin embargo, no deben descartarse otros factores que podrían estar involucrados en el movimiento de esporas a los sitios de infección en el árbol, tales como el viento y las hormigas (Díaz Balderas y Romero Cova, 1980; Noriega, 1996).

Desde hace más de 40 años se ha reportado evidencia de que el agente causal de la malformación del mango es un hongo. Grupos de investigadores en la India al usar pruebas de patogenicidad fueron los primeros en mostrar que *Fusarium moniliforme* (nombrado posteriormente como *F. subglutinans*) era responsable de la malformación floral (Summanwar *et al.*, 1966) y la malformación vegetativa (Varma *et al.*, 1974). Posteriormente otros autores en Egipto (Ibrahim *et al.*, 1975), África del

Sur (Manicom, 1989), EUA (Ploetz y Gregory, 1993), México (Díaz Balderas y Romero Cova, 1980; Noriega, 1996; Rodríguez-Alvarado *et al.*, 2008) e Israel (Freeman *et al.*, 1999) han realizado investigaciones que demuestran la asociación consistente del hongo con el tejido enfermo de mango y han reproducido la enfermedad en diversas pruebas de patogenicidad.

Freeman *et al.* (1999) transformaron un aislamiento *F. subglutinans* obtenido de panículas malformadas de mango, con el gen marcador GUS ( $\beta$ -glucuronidasa) y el gen para resistencia al antibiótico higromicina, inocularon suspensiones de conidios en yemas apicales y laterales en dormancia en plántulas de mango en invernadero. Los cinco transformantes de *F. subglutinans*, al igual que el aislamiento original de *F. subglutinans* sin transformar, causaron los síntomas de la malformación en tejidos floral y vegetativo de 6 a 8 semanas después de la inoculación. El micelio teñido con GUS fue observado dentro de los órganos infectados de las plantas de mango.

## 2.4 Morfología de *Fusarium*

El género *Fusarium* fue descrito por Link en 1809. Este hongo es patogénico en plantas, humanos y animales domesticados. En una lista reciente de la Sociedad Americana de Fitopatología, de enfermedades de plantas se indica que *Fusarium* es el agente causal de enfermedades en 81 de las 101 especies de plantas económicamente importantes. Los tipos de enfermedades que produce y su severidad son muy variados, incluyen pudriciones de tallos y raíces, canchros, marchitamientos, pudriciones de frutos o semillas y enfermedades en las hojas. El género *Fusarium* posee un gran número 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 de las especies han cambiado, muchos han permanecido estables aún cuando son desafiados con criterios genéticos y moleculares (Leslie y Summerell, 2006).

### **2.4.1 Micelio**

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

### **2.4.2 Macroconidios**

Es el carácter morfológico más importante para la identificación de especies de *Fusarium*. En algunos casos la morfología de los macroconidios es suficiente para la identificación del aislamiento. Se recomienda el uso del medio CLA para su observación. El primer carácter observable es el tamaño, que en la mayoría de los casos es un carácter relativamente constante y las variaciones en su longitud pueden significar que hay problemas con el medio de cultivo utilizado. El número de septos presentes se ve determinado por el rango de su tamaño (Leslie y Summerell, 2006).

Los macroconidios pueden ser de tres tipos. En el primer tipo son rectos, la mayoría son delgados, semejantes a una aguja. En el segundo tipo presentan una curvatura a todo lo largo o sólo en una porción de la espora. En el tercer tipo presentan el lado dorsal más curvado que el lado ventral, en estos macroconidios las células centrales usualmente son más anchas que las células terminales.

Los extremos de los macroconidios con frecuencia son importantes para la determinación morfológica. La forma de la célula apical y la del pie puede usarse para delimitar especies. Existen cuatro formas de células apicales: roma, papilado, como gancho y como huso. La célula basal o pie también tiene cuatro formas: en forma de pie, forma de pie largo, muesca y muesca ligera (Leslie y Summerell, 2006).

### **2.4.3 Microconidios**

Los microconidios no son producidos por todas las especies de *Fusarium*, por lo que su sola presencia es un carácter importante. El tamaño, forma y número de septos de los microconidios, las células conidióforas en las cuales nacen y su arreglo

en los conidióforos son caracteres importantes y potenciales para un diagnóstico. El número de septos usualmente es cero ó uno, pero algunas especies pueden producir conidios con dos septos. Las formas más comunes son: reniforme, obovada, piriforme, napiforme, globoso, esférico y fusiforme. Algunas especies de *Fusarium* pueden producir más de una forma de microconidios en medio de cultivo.

*Fusarium* puede presentar dos tipos de células conidióforas o fiálides: monofiálides y polifiálides. La diferencia entre las dos es el número de aperturas por célula en las cuales son producidos los microconidios. Las monofiálides tienen sólo una apertura por célula, mientras que las polifiálides tienen más de una. La longitud de las células conidióforas también es importante ya que pueden ser largas y cortas. El arreglo de los microconidios en las fiálides puede ser sencillo, en cadenas o en falsas cabezas. El número de microconidios en las cadenas puede variar de unas cuantas esporas a un número considerable. La formación de cadenas puede depender del medio usado. Las especies de *Fusarium* no producen cabezas verdaderas como las encontradas en otros hongos, p. e. *Aspergillus*, pero puede producir masas de esporas al final de las fiálides que semejan superficialmente falsas cabezas (Leslie y Summerell, 2006).

#### **2.4.4 Clamidosporas**

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



#### **2.4.5 Otros caracteres**

En adición a los macroconidios, microconidios y clamidosporas, algunos otros caracteres pueden ser usados para la delimitación de especies que no son observados en todas las especies. Las hifas enrolladas son importantes para algunas especies, particularmente *F. circinatum* y *F. sterilihyphosum*. Algunas especies producen cristales en el medio.

La telomorfosis (estado sexual) puede ser una carácter definitivo en especies, normalmente estos estados sexuales se observan bajo condiciones controladas de laboratorio más que en el campo y aunque su morfología no es por lo general suficientemente diferente para ser usado como un marcador para la identificación, su formación puede ser muy importante (Leslie y Summerell, 2006).

#### **2.4.6 Caracteres secundarios**

El más importante de los caracteres secundarios es la pigmentación. Las condiciones de cultivo y el medio son críticos para la producción de pigmentos comparables, algunos de los cuales son altamente sensibles a la luz mientras que otros son sensibles al pH del medio dentro del cual han sido excretados. Usualmente se utiliza el medio PDA con una exposición a la luz y oscuridad de 12:12 horas y son evaluados aproximadamente a la semana de ser incubados. Para hacer comparaciones de colores se utilizan guías estándar como la de Kornerup & Wanscher (Leslie y Summerell, 2006).

### **2.5 Relación taxonómica y criterios de identificación de las especies de *Fusarium* involucradas en la malformación del mango**

El nombre de *Fusarium subglutinans* se ha utilizado para determinar a un grupo taxonómico de hongos que producen estructuras reproductivas asexuales y causan enfermedades en varios cultivos (mango, pino, piña, entre otros). Algunos de estos hongos son capaces de producir estructuras reproductivas sexuales en ensayos de apareamiento, por lo que se les ha colocado taxonómicamente como parte de un complejo de especies dentro del género *Gibberella fujikuroi* (Sawada) Ito



in Ito y K. Kimura (Leslie, 1995; Britz *et al.*, 1999), en donde cada uno representa un linaje distinto (Leslie, 1995; O'Donnell *et al.*, 1998, 2000; Britz *et al.*, 1999; Steenkamp *et al.*, 1999, 2000). Esos linajes son difíciles de distinguir al usar caracteres morfológicos convencionales (Leslie y Summerell, 2006), pero pueden distinguirse a través de pruebas de apareamiento y de patogenicidad (Leslie, 1995).

Actualmente se utilizan técnicas de identificación molecular para complementar la caracterización morfológica utilizada tradicionalmente en la clasificación de las especies de hongos (Bridge y Arora, 1998 citados por Calle, 2005). La amplificación de secuencias específicas de ácidos nucleicos tiene una alta sensibilidad para discriminar entre diferentes aislados de un mismo género y especie; además, permite procesar un gran número de muestras en un corto tiempo (Alves *et al.*, 2002). La ventaja de la secuenciación de regiones del DNA es que representa otra faceta de la variación de los organismos y al muestreo de un universo muchísimo más amplio de caracteres comparado con el conjunto normalmente reducido de caracteres morfológicos, anatómicos o ultra estructurales disponibles (De Luna *et al.*, 2005). Así, se han comparado secuencias de los genes de  $\beta$ -tubulina (O'Donnell *et al.*, 1998; Steenkamp *et al.*, 2000), de la histona *H3* (Histona) (Steenkamp *et al.*, 1999, 2000), del factor de elongación 1- $\alpha$  (factor de elongación) de la traducción y de la calmodulina (O'Donnell *et al.*, 2000), que distinguen rápidamente los diferentes linajes de *F. subglutinans*.

El factor de elongación es reconocido como el punto de inicio de la traducción del RNA para la regulación del crecimiento y desarrollo de los organismos como respuesta a los cambios del medio ambiente (Robaglia y Caranta, 2006). La histona es una región bien conservada esencial para la supervivencia de las células debido a su papel fundamental durante la mitosis, también asociada al loci del gen que activa la transcripción y finalmente se sugiere que esta región puede actuar como "dominio de reconocimiento por chaperonas" (Hake y Allis, 2006). B-tubulina está asociado con muchas funciones esenciales para las células, incluidas la morfogénesis celular,

transportación de organelos y vesículas, segregación cromosómica formación de la pared celular y la división celular (Myung-Hyun *et al.*, 2008).

En estudios comparativos de las secuencias de los genes de la histona y de la  $\beta$ -tubulina, realizados con aislamientos obtenidos de tejidos malformados de mango en Sudáfrica, se detectaron dos grupos filogenéticamente distintos (Steenkamp *et al.*, 1999, 2000). Un grupo representa un linaje no descrito del complejo *G. fujikuroi*, mientras que el segundo grupo es co-específico con aislamientos previamente reportados como causantes de la malformación en mango (Steenkamp *et al.*, 2000). Britz *et al.*, (2002) analizaron los aislamientos estudiados en los reportes anteriores junto con aislamientos de *Fusarium* obtenidos de malformaciones de mango en diferentes áreas geográficas del mundo, mediante características morfológicas y de apareamiento. Estos autores encontraron que todos los aislamientos pueden agruparse taxonómicamente en tres grupos; a uno de los grupos pertenecen los aislamientos llamados *F. subglutinans* obtenidos en Egipto, Florida (EUA), Israel, Malasia y Sudáfrica (Britz *et al.*, 2002) y para el cual los autores propusieron el nombre de *Fusarium mangiferae*. El segundo grupo corresponde a aislamientos obtenidos de plantas malformadas en Sudáfrica (Britz *et al.*, 2002), en Brasil (Zheng y Ploetz, 2002), para los que se propuso la especie *F. sterilihyphosum*. El grupo restante incluye tres aislamientos obtenidos en tejido malformado de mango en Malasia. Aún cuando las características morfológicas de este último grupo son diferentes a los anteriores, el escaso número de colectas no permite asignarle un nuevo taxón (Marasas *et al.*, 2006).

### **2.5.1 Especies de *Fusarium* asociadas a la malformación del mango**

Las investigaciones realizadas (Steenkamp *et al.*, 1999, 2000; Britz *et al.*, 2002; Zheng y Ploetz, 2002; Marasas *et al.*, 2006) reportan a las especies *F. sp.*, *F. mangiferae*, y *F. sterilihyphosum* como agentes causales de la enfermedad en el mundo. *F. oxysporum* también ha sido reportada como causante de malformación, en Egipto, México e India (Bhatnagar y Beniwal, 1977; Kumar y Beniwal, 1992; Ochoa *et al.*, 1994; El Khoreiby, 1997 citado por Ploetz, 2003) aunque su capacidad de

ocasionarla no ha sido claramente demostrada (Ploetz y Prakash, 1997). Las características morfológicas de las especies antes mencionadas según Leslie y Summerell (2006) se describen en los siguientes párrafos.

#### **2.5.1.1 *Fusarium mangiferae* Britz, Wingfield & Marasas**

*F. mangiferae* ha sido reportado como agente causal de la malformación vegetativa y floral del mango en África del Sur, Brasil, Egipto, Estados Unidos, India, Israel, Malasia y Pakistán. Su estado sexual se desconoce y el sinónimo común es *F. subglutinans*. No desarrollan clamidosporas (Leslie y Summerell, 2006).

En medio PDA producen micelio blanco flooso (con matas o aglomeraciones de micelio dispersas en el medio), con pigmentos claros a púrpura oscuro en el agar.

Los macroconidios son producidos abundantemente en esporodocios de color crema a naranja que se desarrollan sobre y alrededor de piezas de hojas de clavel en medio CLA. Presentan paredes delgadas, son largos y delgados y de forma recta a ligeramente curva, forma típica de las especies del complejo *Gibberella fujikuroi*. La célula apical es curva a casi doblada, mientras que la célula basal presenta una forma de pie. El número de septos es de tres a cinco.

Los microconidios son generalmente de forma obovoide a oval. Usualmente no presentan septos, pero puede haber microconidios con un septo. Se desarrollan de manera abundante en el micelio aéreo en falsas cabezas con cinco esporas. Las células conidiógenas se encuentran en mono y polifialides.

#### **2.5.1.2 *Fusarium sterilihyphosum* Britz, Marasas & Wingfield**

*F. sterilihyphosum* ha sido asociado con la enfermedad malformación de la inflorescencia del mango en Sudáfrica. Su estado sexual se desconoce. No desarrollan clamidosporas. Se presentan hifas enrolladas estériles.

En medio PDA las colonias tienen un micelio flocoso y blanco, con una pigmentación rosa a púrpura claro en el agar.

Esta especie casi no produce macroconidios. Cuando se producen se desarrollan en esporodoquios de color crema a naranja. Los macroconidios son relativamente delgados, escasamente falcados, con tres a cinco septos y de pared delgada. La forma es típica de las especies del complejo *Gibberella fujikuroi*. La célula apical presenta un pico pequeño, mientras que la célula basal tiene forma de pie.

Los microconidios son de forma obovoide a ovoide, sin septos o con uno. Se desarrollan de manera abundante en el micelio aéreo en falsas cabezas. Las células conidiógenas ocurren en mono y polifíalides. Las fiálides pueden ser largas (Leslie y Summerell, 2006).

### **2.5.1.3 *Fusarium oxysporum***

*F. oxysporum* es un patógeno importante que causa el marchitamiento vascular de muchas especies de plantas en el ámbito mundial. Además, es un saprófito común del suelo. Su estado sexual se desconoce. La mayoría de los aislamientos producen clamidosporas de manera abundante; sin embargo, hay aislamientos que producen muy pocas o ninguna. Las clamidosporas pueden formarse individualmente o en pares, en racimos o en cadenas cortas. Pueden ser terminales o intercalares en hifas aéreas o sumergidas en el medio. La apariencia de las clamidosporas varía de lisa a rugosa.

En medio PDA la morfología de las colonias varía ampliamente. El micelio puede ser flocoso, escaso o abundante, de color blanco a violeta ligero. Algunos aislamientos producen abundantes macroconidios en una masa central y abundantes esclerocios pequeños de color café claro, azul a violeta. *F. oxysporum* usualmente produce pigmentos en el agar de color violeta pálido a oscuro o magenta; aunque algunos aislamientos no producen pigmentos.

La mayoría de los aislamientos producen esporodoquios abundantes de color naranja pálido, sin embargo, algunos aislamientos producen muy pocos o ninguno. En algunos aislamientos los macroconidios son escasos, pero en general la mayoría los producen de manera abundante en los esporodoquios y ocasionalmente de hifas que crecen sobre la superficie del medio. Los macroconidios son de tamaño corto a mediano, delgados, rectos a ligeramente curvos, y con pared delgada. La célula apical es algo curva, y en ocasiones con un pequeño gancho. La forma de la célula basal varía de tipo pie a puntiaguda. Usualmente se presentan tres septos. Los macroconidios se desarrollan en monofiálides de conidióforos ramificados producidos en esporodoquios, y en menor escala en monofiálides de hifas.

Los microconidios son de forma oval, elíptica o reniforme, y usualmente sin septos. Se desarrollan de manera abundante en el micelio aéreo en falsas cabezas. Las células conidiógenas ocurren en monofiálides cortas (Leslie y Summerell, 2006).

## **2.6 Construcción de árboles filogenéticos**

El alineamiento es una herramienta cualitativa que permite dar los primeros pasos hacia la conclusión de que dos o más secuencias son homólogas al hacerlas coincidir en aquellas regiones en las que se repitan el mayor número de monómeros (caracteres) posibles (Kumar y Filipski, 2001). Los árboles filogenéticos son diagramas que muestran los supuestos lazos genealógicos y la secuencia de eventos históricos que unen organismos, poblaciones o taxas (Wiley, 1981 citado por Calle, 2005).

La mayoría de los métodos utilizados para las inferencias filogenéticas en secuencias moleculares están basados en los principios de optimización, bajo este principio los árboles preferidos están determinados por la asignación de una medida óptima a todas las posibles topologías (o todas las topologías potencialmente correctas). Así, el Método de Máxima Parsimonia utiliza las sinapomorfias para postular hipótesis de relaciones y escoger el árbol con el menor número de pasos

(Swofford, 2001), bajo este enfoque, el árbol más corto es el que mejor “ajusta” los datos (De Luna *et al.*, 2005).

Los métodos probabilísticos se basan en el concepto estadístico de verosimilitud ajustado a los datos observados y las predicciones calculadas de un modelo probable de evolución (Ronquist, 2004; De Luna *et al.*, 2005), bajo este enfoque el árbol óptimo es el de máxima verosimilitud. La estimación de la filogenia basada en la probabilidad posterior más alta de distribución de árboles es la Cadena de Markov Monte Carlo (MCMC) del método Bayesiano que abre la posibilidad de combinar análisis de datos y sus propiedades en los procesos evolución (Altekar *et al.*, 2004; Nylander *et al.*, 2004).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Descripción de los sitios de muestreo y colecta del material enfermo

Se muestrearon 14 huertas de mango de las variedades Ataulfo y Haden, y del tipo criollo ubicadas en los municipios de Apatzingán, Coalcomán, Gabriel Zamora, Taretan y Tepalcatepec (Fig. 2, Cuadros 1A y 2A), que presentaban incidencias altas de la enfermedad malformación.



**Figura 2. Ubicación geográfica de los municipios de Michoacán en donde se colectaron las muestras de mango con malformación vegetativa y floral.**

Las características geográficas y climatológicas de los municipios estudiados se describen a continuación:

**Taretan:** Se localiza al oeste del Estado, a una altura de 1,130 metros sobre el nivel del mar. Presenta clima templado con lluvias en verano (Aw), precipitación pluvial anual de 1,560 mm y temperaturas que oscilan entre 14.4 y 29.7 °C, su temperatura media es de 22 a 26 °C.

**Coalcomán:** Se localiza al suroeste del Estado, a 1,000 metros sobre el nivel del mar. Presenta clima templado y tropical, ambos con lluvias en verano (Cw y Aw), precipitación pluvial anual de 1,255 mm con temperaturas que oscilan entre los 15.7 y 31.8 °C, su temperatura media va de 22 a 24 °C.

**Tepalcatepec:** Se localiza al oeste del Estado, a una altura de 370 metros sobre el nivel del mar. Presenta clima tropical con lluvias en verano al sur y seco y estepario en el resto del municipio (Aw y Bs respectivamente), precipitación pluvial anual de 822 mm, y temperaturas que oscilan entre 12 y 44.5 °C, la temperatura media es de 26 °C.

**Apatzingán:** Se localiza en el sureste del Estado, a una altura de 300 metros sobre el nivel del mar. Presenta clima tropical con lluvias en verano y seco estepario (Aw y Bs), precipitación pluvial anual de 924 mm y temperaturas que oscilan de 8 a 39.8 °C, temperatura media mayor a 26 °C.

**Gabriel Zamora:** Se localiza al suroeste del Estado, a 640 metros sobre el nivel del mar. Presenta clima tropical con lluvias en verano y seco estepario (Aw y Bs), precipitación pluvial anual de 744 mm y temperaturas que oscilan de 17 a 35 °C, temperatura media mayor a 26 °C.

Se tomaron muestras sintomáticas de tejidos floral y vegetativo producidas en el ciclo de crecimiento actual; estas muestras se colocaron dentro de bolsas de plástico debidamente etiquetadas y se almacenaron en hieleras para preservarlas durante su traslado al laboratorio.



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

Se prepararon volúmenes de 250 mL para cada uno de los medios, los cuales se usaron inmediatamente o almacenaron a 25 °C hasta su uso. Los ingredientes de cada medio se pesaron y colocaron en frascos de 500 mL, se agregaron 250 mL de agua destilada y disolvieron en horno de microondas. Los medios fueron esterilizados en una autoclave a 121 °C y 15 lb de presión por 20 min. Al finalizar la esterilización se colocaron en baño María a 49 °C hasta estabilizar. Posteriormente, los medios se vaciaron en cajas Petri de 100 x 15 mm o 60 x 15 mm, en una cámara de flujo laminar estéril. Las cajas Petri con los medios de cultivo se almacenaron en bolsas de plástico. Los medios utilizados en este estudio fueron los que recomiendan Leslie y Summerell (2006) para el análisis y caracterización del género *Fusarium*.

#### **3.2.1 Medio Papa Dextrosa Agar 1X (1X PDA)**

Para su elaboración se cocieron 62.5 g de rodajas de papas frescas en agua destilada. La infusión obtenida se filtró a través de dos capas de gasa, el volumen final se aforó a 250 ml, se transfirió a un frasco de 500 ml y agregaron 2.5 g de dextrosa y 4.5 g de agar. Se dejó deshidratar por siete días.

#### **3.2.2 Medio Papa Dextrosa Agar 1/2 X (1/2XPDA)**

Este medio se preparó de la misma manera que el 1X PDA, solo que la fuente de carbohidratos (dextrosa y papa) se redujo a la mitad de la concentración antes mencionada. Se deshidrató por siete días.

#### **3.2.3 Medio Agar Agua 2 % (AA)**

Se disolvieron 5 g de agar en 250 ml de agua destilada. Se dejó deshidratar por siete días.

#### **3.2.4 Medio Agar Agua Hojas de Clavel (CLA)**

Este medio se preparó de manera similar al medio AA. Justo antes de vaciar el medio en las cajas Petri 60 x 15 mm se agregaron cinco piezas de hojas de clavel estériles a cada caja. Las hojas de clavel esterilizadas por radiación gama fueron

proporcionadas por el Dr. Raúl Rodríguez Guerra (INIFAP, Celaya, Guanajuato). Se dejó deshidratar por cuatro días.

### **3.2.5 Medio Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA)**

Este medio contenía los siguientes ingredientes en gramos por 250 ml de medio:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.25 g,  $\text{KNO}_3$  0.25 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.125 g,  $\text{KCl}$  0.125 g, glucosa 0.05 g, sucrosa 0.05 g y agar 5 g. Después de que el medio se vació en las cajas Petri y gelificó, se colocaron dos piezas de un  $\text{cm}^2$  de papel filtro (Whatman No. 1) estéril sobre la superficie del agar. Se dejó deshidratar por cuatro días.

## **3.3 Obtención de aislamientos de *Fusarium***

### **3.3.1 Siembra del tejido malformado**

Las muestras de tejido se lavaron con detergente y agua por 30 minutos para eliminar polvo, insectos y ácaros, y se cortaron en trozos de tres cm de longitud para facilitar su manipulación; estas secciones se desinfectaron en hipoclorito de sodio comercial (Clorox®) diluido en agua (1:6) por 10 minutos y enjuagaron con agua destilada estéril dos veces. Posteriormente, las muestras de tejido se secaron con papel estéril, se cortaron en secciones de 1-2 mm y sembraron en cajas con medio 1/2 XPDA. Las cajas se sellaron con Parafilm, se etiquetaron e incubaron a 25 °C por 24 a 48 horas en oscuridad. Del micelio que se desarrolló en las secciones de tejido, se transfirieron puntas de hifa a cajas Petri con medio SNA con el propósito de obtener una abundante producción de conidios. Los cultivos se incubaron bajo luz blanca y negra a 25 °C por dos a tres semanas.

### **3.3.2 Cultivos monospóricos y preservación de los aislamientos *Fusarium***

Se tomaron trozos de medio SNA de dos x tres mm con micelio de dos a tres semanas de crecimiento y se colocaron en tubos de ensaye con 5 mL de agua destilada estéril. Los tubos se agitaron manualmente hasta conseguir una suspensión de conidios, se tomaron 30  $\mu\text{L}$  con micropipeta y se depositaron sobre la superficie de cajas Petri 100 x 15 mm con medio AA. La gota de agua con la

suspensión de conidios se distribuyó sobre la superficie del medio con una varilla de vidrio estéril. Las cajas se incubaron a 25 °C en oscuridad por 20 horas. Después del periodo de incubación, se transfirieron por separado conidios germinados con ayuda de microscopio estereoscópico a cajas de Petri con medio de cultivo SNA e incubaron a 25 °C por 3 semanas. Se colocó un conidio por caja.

A las colonias desarrolladas por tres semanas en medio SNA a partir de los conidios germinados, se les agregaron 4 ml de glicerol 25 % estéril. El glicerol se agitó suavemente con ayuda de la micropipeta para desprender los conidios del micelio, esta suspensión de conidios se transfirió a viales criogénicos estériles que se almacenaron a -70 °C. En los experimentos de caracterización de los aislamientos de *Fusarium* se utilizaron alícuotas de estas suspensiones de conidios.

### **3.4 Caracterización cultural y morfológica de los aislamientos de *Fusarium***

#### **3.4.1 Características culturales en medio 1XPDA.**

Para cada aislamiento estudiado se inocularon 20 µL de suspensión de conidios en glicerol a 25 % en cajas Petri con medio PDA preparado 7 días antes de ser utilizado. Se determinó el tipo y espesor del micelio, el color de la colonia, pigmentación del agar, presencia y color de esporodoquios, así como la presencia de clamidosporas e hifas enrolladas. Se hicieron revisiones a los 15, 30 y 60 días.

#### **3.4.2 Características morfológicas en medio CLA.**

Se inocularon 20 µL de suspensión de conidios en glicerol al 25 % en cajas Petri con medio CLA preparado cuatro días antes de ser utilizado. Las observaciones se hicieron 10 días posteriores a la inoculación del medio. Para determinar el tamaño de los macroconidios y microconidios se midieron (largo y ancho) 25 conidios de cada tipo por aislamiento en un microscopio compuesto. Se determinó la forma, tipo de pie y célula apical y número de septos de los macroconidios. Se determinó la forma, disposición y tipo de fiálide de los microconidios. Además se determinó la presencia de esporodoquios, clamidosporas e hifas enrolladas.

### **3.4.3 Tasa de crecimiento en medio 1X PDA**

Para cada aislamiento estudiado se inocularon 5 µl de la suspensión de conidios en glicerol al 25 % en cajas con medio SNA. Las cajas se incubaron por 7 días a 25 °C en oscuridad. Posteriormente se transfirió un disco de 6 mm de diámetro al centro de una caja Petri con medio 1X PDA, se selló con papel Parafilm y se incubó a 25 °C en oscuridad durante 72 horas. Se utilizaron tres repeticiones (cajas de Petri inoculadas) de cada aislamiento por experimento. Al término de la incubación se analizó el crecimiento micelial promedio por día, se midió el diámetro de la colonia en los ejes horizontal y vertical. El experimento se realizó dos veces.

Los datos de las variables registradas se sometieron a un análisis de varianza mediante el procedimiento GLM y prueba de Tukey para la comparación de medias entre tratamientos con el uso del programa estadístico SAS versión 9.0.

### **3.5 Extracción de ácidos nucleicos**

Se inocularon 5 µl de solución de conidios en el centro de cajas Petri con medio SNA, y se incubaron a 25° C por siete días. De cada colonia micelial se colectaron 10 discos de medio con micelio de 1 cm de diámetro, se transfirieron a matraces Erlenmeyer de 250 ml de capacidad con 60 ml de medio SN y se incubaron estáticos a 25 °C por 7 días. El micelio desarrollado se filtró con un embudo y tela Miracloth, se lavó con agua destilada estéril, y se colocó extendido en el interior de morteros estériles. Los morteros con el micelio se cubrieron con papel aluminio estéril y almacenaron a 4 °C por siete días para su deshidratación. Posteriormente, el micelio se maceró con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino y se almacenó a -20 °C en microtubos estériles de 1.7 mL. El ADN se extrajo de acuerdo al protocolo descrito por Mahuku (2004).

### **3.6 Amplificación de ADN por PCR para estudios filogenéticos y taxonómicos**

Se utilizaron los oligonucleótidos EF-1/2 para el factor de elongación (EF-1), H3-1a/b para histona y T1/T21 y T121/T22 para β-tubulina. Los oligonucleótidos para el factor de elongación descritos por O'Donnell *et al.*, (1998), hibridan dentro de los exones conservados del factor de elongación para amplificar porciones de la región

codificadora que incluye intrones, los oligonucleótidos H3-1a/b descritos por Glass y Donaldson (1995), amplifican 455 pares de bases del gene H3 y para  $\beta$ -tubulina se utilizaron los pares de oligonucleótidos T1/T21 y T121/T22 que amplifican 337 y 466 pares de bases respectivamente, (O'Donnell y Cigelnik, 1997).

Para la amplificación de las secuencias se utilizó el kit PCR Master Mix (Promega), con una temperatura de desnaturalización de 94 °C, una temperatura de hibridación de 55 °C, y una temperatura de elongación de 72 °C, por 35 ciclos, en un termociclador gradient (Eppendorf). Las muestras de las amplificaciones se analizaron electroforéticamente en geles de agarosa al 2 % TAE a 50 volts por 120 minutos. Los fragmentos amplificados se purificaron con un kit comercial (QIAquick PCR Purification Kit- QIAGEN). El ADN purificado se envió a una compañía externa para su secuenciación en ambas direcciones del gen (3' a 5' y viceversa). Las lecturas de éstas se compararon con su secuencia complementaria a través del Programa Sequencher 4.8.

Las secuencias obtenidas de los aislamientos fueron editadas y alineadas con el Programa Bioedit version 7.0.5.2 con secuencias homólogas de *F. oxysporum*, *F. mangiferae* y *F. sterilihyphosum* obtenidas del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) (Cuadro 1). Para poder hacer comparables las diferentes secuencias correspondientes a un gen, se realizó un proceso de alineación por medio del programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994). En este proceso se insertaron espacios entre las bases de tal manera que, cada una de las bases de una secuencia se correspondió con la base homóloga de las restantes secuencias incluidas en el análisis.

Con la matriz de secuencias alineadas se realizaron análisis cladísticos para cada gen por separado y en combinación de éstos, con el criterio de parsimonia por medio del programa PAUP, todos los análisis filogenéticos se ejecutaron con el programa Paup\* 4.0b (Swofford, 2003). Los análisis de Máximas Parsimonias se ejecutaron con 100 réplicas adicionales al azar en una búsqueda heurística con TBR. Bootstrap con 100 réplicas en una búsqueda heurística con TBR brindó la estabilidad

de los clados. Los programas Paup y ModelTest versión 3.7 (Posada y Crandall, 1998) se usaron para seleccionar los modelos alternos de evolución para Likelihood. Los análisis filogenéticos Bayesianos se ejecutaron con el programa de MrBayes 3.0b4 (Huelsenbeck y Ronquist, 2001) con Cadenas de Markov Monte Carlo (CMCM) las cuales comenzaron con un árbol al azar y corrieron por un millón de generaciones, finalmente se realizaron consensos de mayoría.

**Cuadro 1. Accesiones del Centro Nacional de Información Biotecnológica de las especies de *Fusarium* asociadas a la malformación de mango**

Especies de <i>Fusarium</i>	Accesiones utilizadas de los genes		
	factor de elongación	histona	$\beta$ -tubulina
<i>F. mangiferae</i>	AF160281 (NRRL25226)	AF236781 (MRC7561)	AF236783 (MRC3478)
		AF150869 (MRC3478)	U61561 (NRRL25226)
		AF150866 (MRC7035)	
<i>F. sterilihyphosum</i>	DQ452859 (CML262) DQ452858 (CML283) DQ452861 (CML345) DQ452860 (CML389)	AF236778 (MRC2802)	DQ445781 (CML262)
		AF236777 (MRC7877)	DQ445785 (CML282)
			DQ445780 (CML283)
			DQ445783 (CML345)
			DQ445782 (CML389)
		AF236784 (MRC7877)	
<i>F. oxysporum</i>	AF160281 (NRRL22902)	AF150832 (MRC6212)	U34424 (NRRL22902)

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Obtención de aislamientos de *Fusarium*

De las muestras sintomáticas de tejido vegetativo o floral con malformación en mango colectadas se obtuvieron 76 aislamientos del hongo *Fusarium* (Cuadro 1A). de los cuales se seleccionaron 28 para llevar a cabo la caracterización morfológica y cultural; en esta selección se incluyeron aislamientos de los cinco municipios muestreados y cada sitio o huerta quedó representada con dos muestras de árboles distintos, preferentemente con tejido malformado vegetativo y floral (Cuadro 2).

### 4.2 Caracterización cultural y morfológica de los aislamientos de *Fusarium*

#### 4.2.1 Características culturales en medio 1X PDA

##### a) Color de la colonia y pigmentación del agar

Los aislamientos mostraron una amplia variación en el color de la colonia al presentar diferentes intensidades de rosa, violeta, amarillo, salmón y café violáceo (Figuras 3, 4 y 5). De igual manera, hubo una amplia variación en el color de la pigmentación del medio de cultivo, con tonos desde rosa hasta violeta grisáceo. Solamente el aislamiento 9 del municipio de Taretan no presentó pigmentación en el medio (Cuadro 3).

Las condiciones ambientales y el medio de cultivo son factores importantes para la producción de pigmentos por especies de *Fusarium*; así, algunas especies son sensibles a la luz mientras que otras lo son al pH del medio de cultivo, lo que ocasiona que las colonias de las especies de *Fusarium* puedan variar ampliamente en sus coloraciones (Leslie y Summerell, 2006). Cuatro de los aislamientos analizados en este estudio presentaron pigmentación púrpura de varias tonalidades en el reverso de la colonia. Este tipo de coloración púrpura es característico de especies de *Fusarium* ubicadas en la sección *Liseola*, en donde se encuentran las especies de *F. subglutinans*, *F. mangiferae* y *F. sterilihyphosum* (Britz *et al.*, 2002; Leslie y Summerell, 2006).

**Cuadro 2. Aislamientos de *Fusarium* obtenidos de tejidos malformado de mango seleccionados para la caracterización morfológica y cultural**

Código de Campo	Código de Laboratorio	Colecta No.	Fecha de Colecta	Municipio	Huerta No.	Árbol No.	Tipo de Tejido
C10 S1 S1 F1	1	10	28-Abr-07	Taretan	1	1	Floral
C10 S1 S2 V1	2	10	28-Abr-07	Taretan	1	2	Vegetativo
C10 S2 S2 V1	5	10	28-Abr-07	Taretan	2	2	Vegetativo
C10 S2 S3 V1	7	10	28-Abr-07	Taretan	2	3	Vegetativo
C10 S3 S1 V1	9	10	28-Abr-07	Taretan	3	1	Vegetativo
C10 S3 S2 F1	12	10	28-Abr-07	Taretan	3	2	Floral
C11 S1 S1 V1	15	11	12-May-07	Coalcomán	4	1	Vegetativo
C11 S1 S3 F1	16	11	12-May-07	Coalcomán	4	3	Floral
C11 S2 S2 V1	19	11	12-May-07	Coalcomán	5	2	Vegetativo
C11 S2 S5 F1	22	11	12-May-07	Coalcomán	5	5	Floral
C11 S3 S1 F1	24	11	12-May-07	Tepalcatepec	6	1	Floral
C11 S3 S4 F1	26	11	12-May-07	Tepalcatepec	6	4	Floral
C11 S4 S1 F2	29	11	12-May-07	Tepalcatepec	7	1	Floral
C11 S4 S3 V1	31	11	12-May-07	Tepalcatepec	7	3	Vegetativo
C11 S5 S2 V1	35	11	12-May-07	Tepalcatepec	8	2	Vegetativo
C11 S5 S3 F1	38	11	12-May-07	Tepalcatepec	8	3	Floral
C11 S6 S2 V1	41	11	12-May-07	Apatzingán	9	2	Vegetativo
C11 S6 S3 F1	43	11	12-May-07	Apatzingán	9	3	Floral
C11 S7 S1 V1	46	11	12-May-07	Apatzingán	10	1	Vegetativo
C11 S7 S3 F1	48	11	12-May-07	Apatzingán	10	3	Floral
C11 S8 S2 F1	50	11	12-May-07	Apatzingán	11	2	Floral
C11 S8 S3 F1	52	11	12-May-07	Apatzingán	11	3	Floral
C12 S1 S1 F1	53	12	01-Jul-07	G. Zamora	12	1	Floral
C12 S1 S2 F1	55	12	01-Jul-07	G. Zamora	12	2	Floral
C12 S2 S2 V1	61	12	01-Jul-07	G. Zamora	13	2	Vegetativo
C12 S2 S4 V1	65	12	01-Jul-07	G. Zamora	13	4	Vegetativo
C12 S3 S1 F2	70	12	01-Jul-07	G. Zamora	14	1	Floral
C12 S3 S2 F2	72	12	01-Jul-07	G. Zamora	14	2	Floral



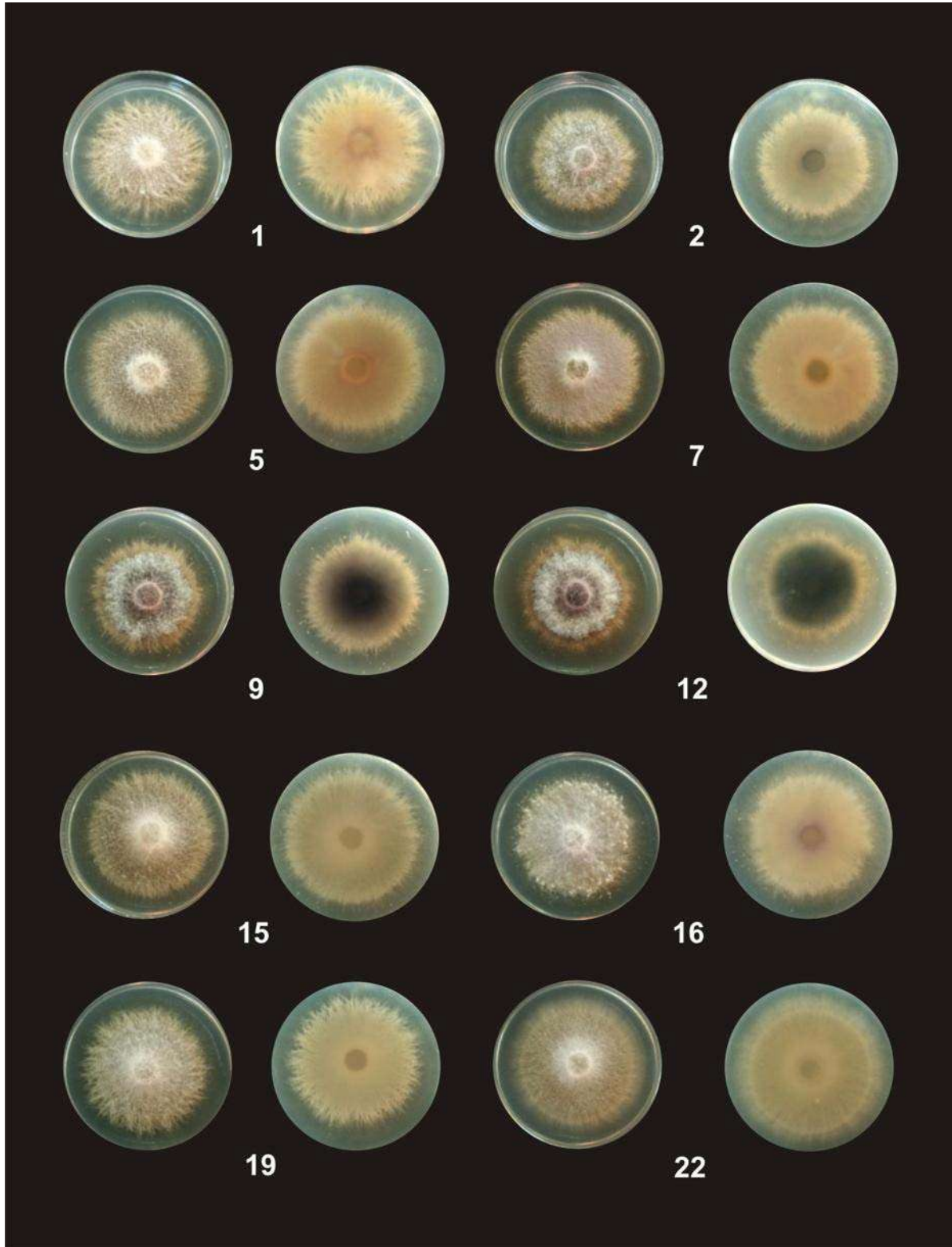


Figura 3. Aislamientos de *Fusarium* spp desarrollados en medio de cultivo PDA vistas por anverso y reverso. Del 1 al 15 Taretan, 16 y 19 Coalcomán, 22 Tepalcatepec.

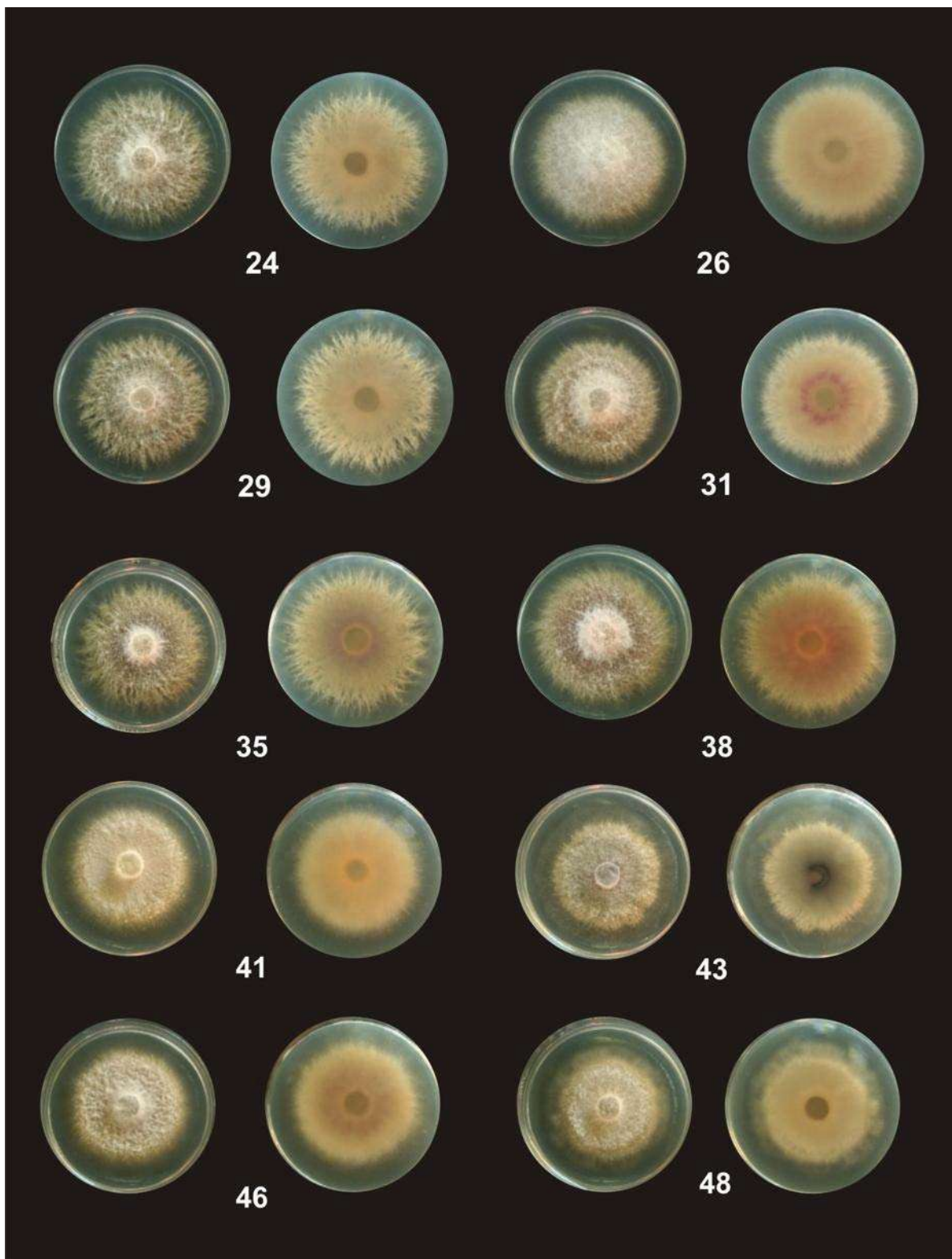


Figura 4. Aislamientos de *Fusarium* spp desarrollados en medio de cultivo PDA vistas por anverso y reverso. Del 24 al 38 Tepalcatepec, 41 a 48 Apatzingán.

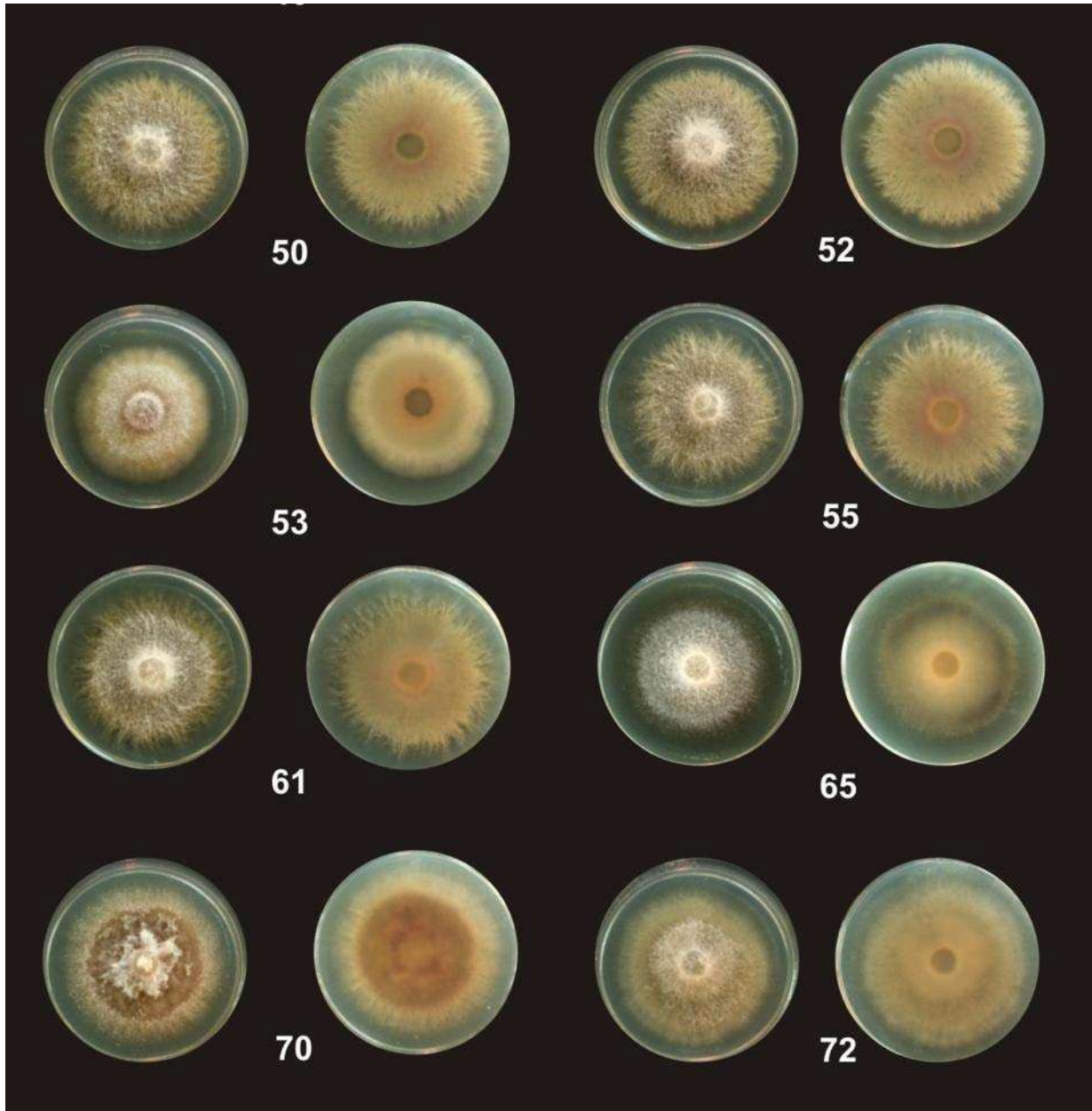


Figura 5. Aislamientos de *Fusarium* spp desarrollados en medio de cultivo PDA vistas por anverso y reverso. El 50 y 52 Apatzingán, 53 a 72 Gabriel Zamora.



**Cuadro 3. Características culturales en medio de cultivo PDA de aislamientos de *Fusarium* obtenidos de tejidos malformados de mango.**

Código de laboratorio	Tipo de micelio	Color de la colonia (arriba)	Color de la colonia (abajo)	Pigmentación del medio de cultivo
1	Abundante y denso	Rosa	Rosa fuerte a violeta	Crema
2	Abundante y denso	Violeta	Violeta	Crema
5	Abundante y denso	Rosa	Violeta	Crema
7	Abundante y denso	Violeta claro	Violeta	Violeta claro
9	Abundante y denso	Violeta fuerte	Violeta fuerte a púrpura	Sin pigmento
12	Abundante y denso	Violeta fuerte	Violeta fuerte a púrpura	Crema grisáceo
15	Abundante y denso	Violeta claro	Violeta	Violeta claro
16	Abundante y denso	Violeta claro	Violeta	Violeta claro
19	Abundante y denso	Violeta claro	Violeta	Violeta claro
22	Abundante y poco denso en periferia	Violeta claro	Violeta	Crema
24	Abundante y denso	Violeta claro y rosa claro al centro	Violeta claro	Violeta claro
26	Abundante y denso	Rosa claro	Amarillo a violeta claro	Crema
29	Abundante y denso	Rosa claro	Amarillo a Violeta claro	Violeta claro
31	Abundante y denso	Rosa claro	Violeta claro	Violeta claro grisáceo
35	Abundante y denso	Rosa claro	Rosa a violeta claro	Violeta claro
38	Abundante y denso	Rosa salmón	Rosa fuerte a violeta	Violeta claro
41	Abundante y denso	Amarillo a naranja	Amarillo a violeta claro	Crema
43	Abundante y denso	Violeta claro a violeta	Violeta claro a Violeta	Crema
46	Abundante y denso	Violeta claro	Violeta claro	Crema
48	Abundante y denso	Violeta claro a violeta	Púrpura a casi negro	Violeta grisáceo
50	Abundante y denso	Violeta claro con rosa claro encima	Rosa con centro violeta fuerte	Violeta claro
52	Abundante y denso	Violeta claro con centro rosa claro y azul	Rosa con centro violeta fuerte	Violeta claro
53	Abundante y denso al centro	Violeta claro	Violeta claro con centro violeta	Crema
55	Abundante y denso	Rosa con centro rosa claro	Rosa con centro violeta	Rosa claro

**Continuación.....Cuadro 3**

<b>Código de laboratorio</b>	<b>Tipo de micelio</b>	<b>Color de la colonia (arriba)</b>	<b>Color de la colonia (abajo)</b>	<b>Pigmentación del medio de cultivo</b>
61	Abundante y denso	Violeta claro con centro casi blanco	Rosa con centro Violeta	Violeta claro
65	Abundante y denso	Salmón	Salmón con centro Naranja	Crema a naranja
70	Abundante y poco denso en periferia	Café violáceo	Café violáceo con centro amarillo	Crema a violeta claro
72	Abundante y denso	Violeta claro a violeta	Rosa con centro Púrpura	Crema grisáceo

**b) Tipo de micelio**

El 90 % de los aislamientos de *Fusarium* produjeron micelio abundante y denso en la superficie del medio de cultivo, a excepción de los aislamientos 22 de Tepalcatepec y 70 de Lombardía que produjeron micelio abundante y poco denso en la periferia y el aislamiento 53 de Apatzingán que produjo micelio abundante y denso sólo en el centro de la colonia (Cuadro 3). El medio de cultivo PDA es un medio rico en carbohidratos, el cual permite un desarrollo micelial aéreo ideal para la observación de sus características (Leslie y Summerell, 2006).

**c) Presencia de hifas enrolladas, esporodoquios y clamidosporas**

Se observó la presencia de hifas enrolladas en 23 de los 28 aislamientos estudiados (Fig. 6), semejantes a las reportadas para algunos de los taxones asociados con la malformación del mango, que incluyen a *F. sterilihyphosum*, quien posee este tipo de hifas (Britz *et al.*, 2002; Leslie y Summerell, 2006; Iqbal *et al.*, 2006; Marasas *et al.*, 2006; Rodríguez-Alvarado *et al.*, 2008; Lima *et al.*, 2009). Este tipo de hifas no se observaron en los aislamientos 2, 43, 53, 65 y 72. Britz *et al.*, (2002) reportan que existen dos especies más capaces de producir hifas enrolladas, *F. circinatum* y *F. pseudocircinatum*; sin embargo, los macroconidios de estas especies son cortos y presentan sólo tres septos, a diferencia de los de *F. sterilihyphosum* que son más largos y tienen de tres a cinco septos.

La ausencia de clamidosporas incrementa la semejanza de estos aislamientos con *F. sterilihyphosum* ya que esta especie no las produce, aunque la falta de esporodoquios en los aislamiento es una característica que los diferencia, *F. sterilihyphosum* si llega a presentarlos aunque en pocas ocasiones. Por otra parte, *F. oxysporum* se caracteriza por producir abundantes clamidosporas, a diferencia de *F. mangiferae* que tampoco las produce (Leslie y Summerell, 2006). Los esporodoquios se presentan frecuentemente en *F. oxysporum* y *F. mangiferae* y son generalmente de color crema a naranja. (Leslie y Summerell, 2006).

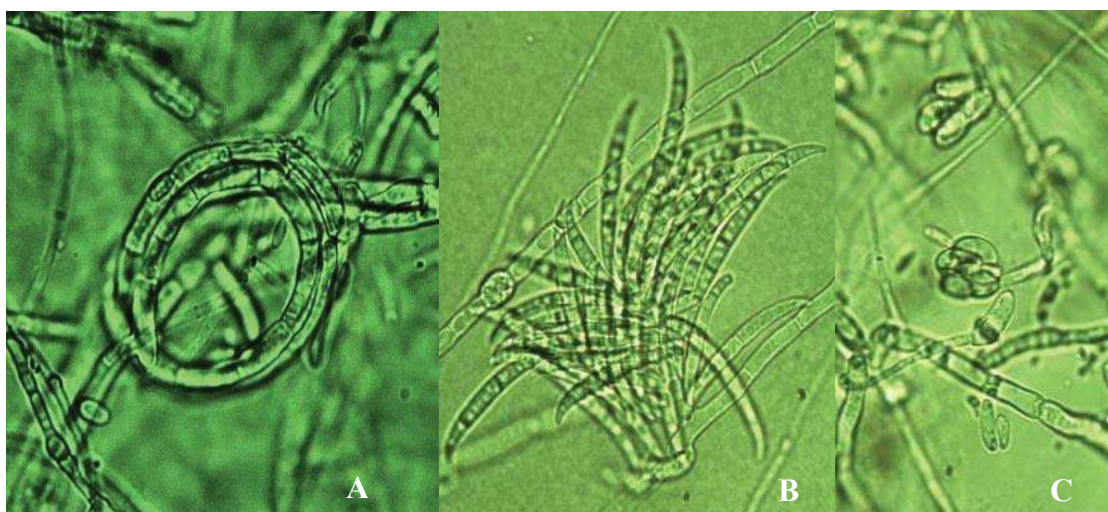


Figura 6. Morfología del aislamiento No. 1. (A) Hifa enrollada; (B) Forma típica de los macroconidios; (C) Microconidios en falsas cabezas.

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

##### a) Macroconidios

Los macroconidios se produjeron de manera abundante en todo el micelio y no en estructuras específicas (esporodoquios). El aislamiento 31 (Tepalcatepec) sobresalió por la gran cantidad de macroconidios producidos en este medio. La forma predominante que se observó fue la típica para las especies del complejo *Gibberella fujikuroi*, con una curvatura dorso ventral a lo largo de la espora. Solamente el aislamiento 41 (Apatzingán) mostró una forma ligeramente recta. El número de septos observados en todos los aislamientos fue de tres a cinco; la célula

apical por lo general fue en forma de gancho o papilada y la célula basal en forma de pie o con una marcada muesca. El rango de tamaño observado fue en promedio de 33.6 a 58.17  $\mu\text{m}$  de largo por 3.43 a 4.3  $\mu\text{m}$  de ancho (Fig. 6 y Cuadro 2A).

Los macroconidios son uno de los caracteres más importantes en la identificación de especies del género *Fusarium*. En medio CLA suelen ser uniformes en tamaño y forma y presentarse entre seis y diez días después de ser inoculado el medio, razón por la cual es recomendado para los estudios de identificación de especies. Por lo general, el número de macroconidios encontrados en *F. sterilihyphosum* es bajo; mientras que, *F. mangiferae* y *F. oxysporum* producen un número relativamente mayor, siendo éstos producidos en esporodoquios (Leslie y Summerell, 2006). El número de septos observados (tres a cinco) es coincidente con el reportado por Britz *et al.* (2002) para las especies de la sección *Liseola*, no así para *F. oxysporum* que presentan únicamente 3 septos (Leslie y Summerell, 2006). El tamaño promedio de los macroconidios de los aislamientos de Michoacán estuvo dentro del rango reportado para *F. mangiferae* (43-61  $\mu\text{m}$ ) y *F. sterilihyphosum* (28-47  $\mu\text{m}$ ) aunque los municipios de Apatzingán y Gabriel Zamora tuvieron macroconidios 10 % más largos que los de *F. sterilihyphosum* (Britz *et al.*, 2002).

Los resultados del análisis de varianza practicado al tamaño de los macroconidios indicaron diferencias estadísticas significativas sobre éste y el municipio del cual provienen (Cuadros 4 y 5A). La longitud mayor de los macroconidios (49.57 y 49.09  $\mu\text{m}$ ) correspondió a las localidades de Apatzingán y Gabriel Zamora, mientras que el menor (38.61  $\mu\text{m}$ ) fue de Taretan. Se encontraron correlaciones positivas de 0.9708 entre la longitud del macroconidio y su lugar de origen. Lo anterior indica que la longitud de los macroconidios es atribuible en 97 % a las características geográficas y de medio ambiente presentes en cada municipio.

Las diferencias en el tamaño de los macroconidios puede ser probablemente una respuesta a las condiciones climatológicas que se presentan en esas regiones,

aunque no se descarta la posibilidad de que sean el resultado del medio de cultivo utilizado y las condiciones en que se desarrollaron. Leslie y Summerell (2006) mencionan que los macroconidios producidos en medio CLA pueden diferir significativamente de los producidos en medio PDA o SNA, de igual forma medios ricos en azúcares producen gran variabilidad en el tamaño de sus conidios. En estudios hechos en *Fusarium* (Nelson, 1983 citado por Sabadell, 2003) menciona que existe una gran variación cultural, aún en una misma línea monospórica.

**Cuadro 4. Tamaño de los macroconidios y microconidios de *Fusarium* obtenidos de tejido con malformación en Michoacán como resultado del municipio de su procedencia.**

Municipio	Largo macroconidio	ancho macroconidio	largo microconidio	ancho microconidio
Taretan	38.61c	3.72b	10.35abc	3.41a
Coalcomán	41.04b	3.88a	10.46ab	3.42a
Tepalcatepec	41.02b	3.62c	9.74c	3.16b
Apatzingán	49.57a	3.94a	9.97bc	3.41a
G. Zamora	49.09a	3.78b	10.82 <sup>a</sup>	3.46a

<sup>1</sup>Letras iguales en una columna indican valores estadísticamente no diferentes ( $p \leq 0.05$ )

### c) Microconidios

En todos los aislamientos de Michoacán se observó la presencia de microconidios de manera abundante, dispuestos en falsas cabezas con menos de cinco esporas en células conidiógenas, simpódicamente ramificadas en monofiálides y polifiálides cortas. La forma observada más frecuente (96 %) fue la oval sin septos, aunque algunos aislamientos presentaron microconidios de forma reniforme y con un septo (Cuadros 5 y 3A).



**Cuadro 5. Concentrado de las características fenotípicas de *Fusarium* spp**

N.D.A.	Tamaño promedio		Tipo de fíalide	Disposición de conidios	Presencia hifas enrolladas	Tasa de crecimiento mm/día
	Macroconidios $\mu\text{m}$	Microconidios $\mu\text{m}$				
1	33.6 X 3.6	10.1 X 3.2	Mono/Poli	Falsa cabeza	+	10.8
2	34.6 X 3.7	9.9 X 3.5	Mono/Poli	Falsa cabeza	-	8.9
5	40.3 X 3.4	11.1 X 3.3	Mono/Poli	Falsa cabeza	+	10.1
7	37.7 X 3.5	10.9 X 3.6	Mono/Poli	Falsa cabeza	+	9.1
9	43.5 X 4.2	11.0 X 3.5	Mono/Poli	Falsa cabeza	+	8.2
12	42.0 X 3.8	9.1 X 3.4	Mono/Poli	Falsa cabeza	+	8.3
15	45.3 X 3.8	9.1 X 3.5	Mono/Poli	Falsa cabeza	+	10.6
16	41.9 X 4	10.6 X 3.4	Mono/Poli	Falsa cabeza	+	10.1
19	41.4 X 3.9	10.2 X 3.5	Mono/Poli	Falsa cabeza	+	9.7
22	35.6 X 3.8	12 X 3.3	Mono/Poli	Falsa cabeza	+	9.8
24	40 X 3.8	9 X 3.4	Mono/Poli	Falsa cabeza	+	9.6
26	44.9 X 3.9	8X 3	Mono/Poli	Falsa cabeza	+	10.4
29	34.5 X 3.5	10.8 X 3.2	Mono/Poli	Falsa cabeza	+	9.6
31	46.1 X 3.5	11.2 X 3.1	Mono/Poli	Falsa cabeza	+	10
35	38.7 X 3.4	9.5 X 2.9	Mono/Poli	Falsa cabeza	+	10
38	42.3 X 3.5	9.9 X 3.2	Mono/Poli	Falsa cabeza	+	10.3
41	57.5 X 3.7	9.22 X 3.3	Mono/Poli	Falsa cabeza	+	9.7
43	58.2 X 4	8.6 X 3.3	Mono/Poli	Falsa cabeza	-	7.9
46	42.5 X 3.9	9.3 X 3.4	Mono/Poli	Falsa cabeza	+	9.6
48	49 X 3.9	10.7 X 3.5	Mono/Poli	Falsa cabeza	+	7.5
50	42.8 X 3.9	10.9 X 3.6	Mono/Poli	Falsa cabeza	+	10
52	47.4 X 4.3	11 X 3.2	Mono/Poli	Falsa cabeza	+	10.6
53	49.1 X 3.7	11.4 X 3.2	Mono/Poli	Falsa cabeza	+	6.9
55	52 X 3.6	10.1 X 3.5	Mono/Poli	Falsa cabeza	+	9.8

**Continuación.....Cuadro 5**

N.D.A.	Tamaño promedio		Tipo de fiálide	Disposición de conidios	Presencia hifas enrolladas	Tasa de crecimiento mm/día
	Macroconidios µm	Microconidios µm				
61	48 X 3.7	11 X 3.6	Mono/Poli	Falsa cabeza	+	9.8
65	50.4 X 4	11.6 X 3.5	Mono/Poli	Falsa cabeza	+	9.1
70	43.9 X 3.8	10.8 X 3.5	Mono/Poli	Falsa cabeza	+	9
72	51 X 3.9	10X 3.5	Mono/Poli	Falsa cabeza	+	9.2

\*N.D.A.= Número de aislamiento

Las especies de *Fusarium* reportadas como causantes de la malformación del mango, *F. oxysporum*, *F. mangiferae* y *F. sterilihyphosum*, presentan microconidios similares a los observados en este trabajo tanto en forma como en tamaño (Britz *et al.*, 2002; Leslie y Summerell, 2006); estas semejanzas acercan a las cepas aisladas de Michoacán con las especies de la sección *Liseola*, a diferencia de *F. oxysporum* que tiene los microconidios no septados y son producidos en células conidiógenas con monofiálides cortas (Leslie y Summerell, 2006).

**d) Clamidosporas**

La formación de clamidosporas no se observó en ningún aislamiento, característica que coincide con las descritas por Britz y col. (2002) y Leslie y Summerell (2006) para las especies de *F. mangiferae* y *F. sterilihyphosum*. *F. oxysporum* por su parte, se caracteriza por una pronta y abundante producción de clamidosporas en la mayoría de sus aislamientos, que pueden ser terminales o intercalares en hifas aéreas, sumergidas o superficiales (Leslie y Summerell, 2006). Esto es indicativo de que los aislamientos obtenidos no son de la especie *oxysporum* la cual se ha reportado para Michoacán (Mora-Aguilera *et al.*, 2003).

### **e) Hifas enrolladas**

En 50 % de los aislamientos analizados se observó la presencia de hifas enrolladas (Cuadro 5). Estas hifas son similares a las que se han reportado para *F. sterilihyphosum* (Britz *et al.*, 2002; Iqbal *et al.*, 2006; Leslie y Summerell, 2006; Marasas *et al.*, 2006; Rodríguez-Alvarado *et al.*, 2008; Lima *et al.*, 2009;) que son una característica que distingue a esta especie de *F. mangiferae*, ambas de la sección *Liseola*.

### **4.3 Tasa de crecimiento micelial en 1XPDA**

Los aislamientos de *Fusarium* mostraron variación en la tasa de crecimiento micelial en un rango de 6.67 a 10.67 mm/día, después de 72 horas de incubación a 25 °C en oscuridad (Cuadro 5A). Por lo general esta tasa permite distinguir las especies de rápido o lento crecimiento; sin embargo, es posible que debido a la variabilidad dentro de las especies, su lugar de origen o factores externos como luz, posición de la caja Petri en el lugar de incubación, etcétera, puedan presentarse diferencias tanto en el crecimiento entre las repeticiones de un mismo aislamiento, como en poblaciones distintas aún de la misma especie, por eso esta tasa, sólo confirma el diagnóstico previo (Summerell *et al.*, 2003). Esto explica las diferencias observadas en la tasa de crecimiento entre las repeticiones de un mismo aislamiento.

Britz y *et al.*, (2002) enfatizan la diferencia que existe en el crecimiento entre las especies *F. mangiferae* y *F. sterilihyphosum* a 25 °C, con 3.4 mm/día y 4.8 mm/día respectivamente; *F. oxysporum* es considerado de rápido crecimiento ya que puede crecer un cm diario (Garcés de Granada *et al.*, 2001). Así, al comparar estas tasas de crecimiento con las observadas en los aislamientos de Michoacán se observó que en todos ellos su velocidad de crecimiento es mayor al de las especies de la sección *Liseola* y semejantes a las de *F. oxysporum*. Sin embargo, esta similitud con *F. oxysporum* por sí sola no es indicativa de que se trate de la misma especie únicamente que ambas coinciden en la tasa de crecimiento.

#### 4.4 Análisis filogenético y taxonómico

La calidad del ADN genómico extraído del micelio, evaluada por electroforesis en geles de agarosa al 2 % TAE, teñidos con bromuro de etidio, resultó adecuada para los estudios que se llevaron a cabo. En los carriles del gel, se muestran las bandas correspondientes a la amplificación de cada gen de las diferentes muestras (Fig. 7).

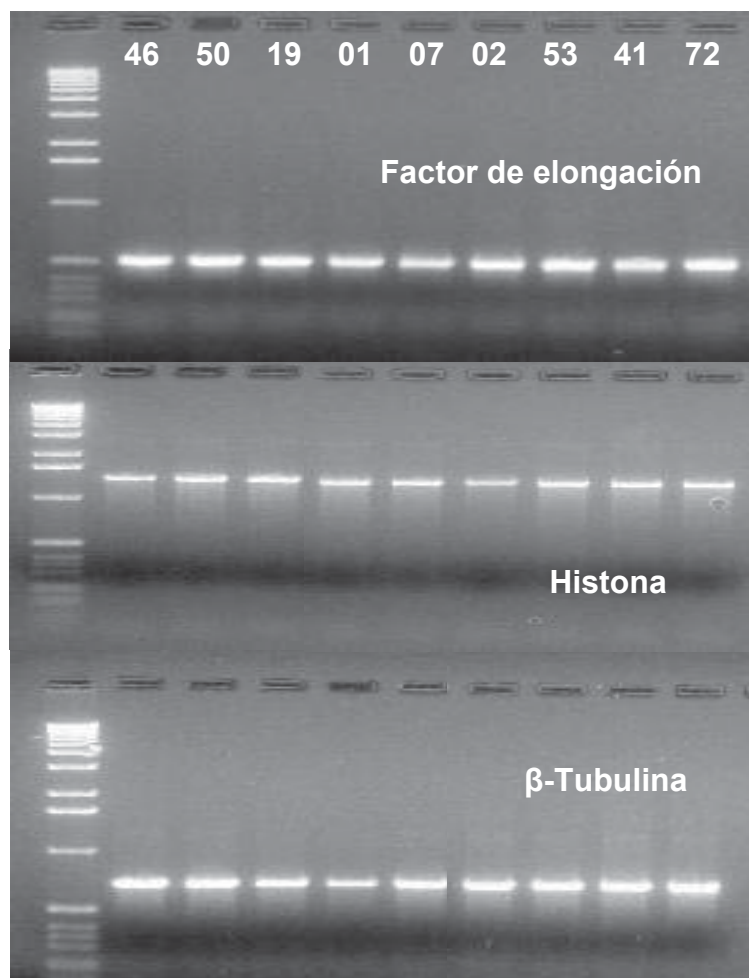


Figura 7. Gel representativo de la amplificación por PCR de los fragmentos de ADN del factor de elongación, histona y  $\beta$ -Tubulina de los cultivos 46, 50, 19, 01, 07, 02, 53, 41 y 72 de *Fusarium* aislados de tejidos malformados vegetativos y florales de mango en Michoacán.

De los 28 aislamientos utilizados en la caracterización morfológica, 19 se seleccionaron para la caracterización genética, todos los municipios quedaron representados (aislamientos 1, 2, 7, 12, 16, 19, 26, 31, 38, 41, 43, 46, 48, 50, 53, 55, 61, 65 y 72). De éstos, 15 aislamientos fueron debidamente secuenciados en ambos sentidos para los tres genes, sólo los aislamientos 16, 19, 55 y 65 no fueron secuenciados adecuadamente para el gen de  $\beta$ -tubulina, lo que impidió que fueran utilizados en la formación de los dendrogramas correspondientes. La longitud de las secuencias obtenidas varió de 600 a 719 pb para el factor de elongación, de 522 a 533 histona y de 1300 a 1346  $\beta$ -tubulina. Todas las secuencias se compararon con su secuencia complementaria a través del Programa Sequencher 4.8 para eliminar posibles errores en las bases de las mismas. Las secuencias revisadas se alinearon con el Programa Bioedit versión 7.0.5.2 (Hall, 1999) con secuencias homólogas obtenidas de Genbank (NCBI) de *F. oxysporum*, *F. mangiferae* y *F. sterilihyphosum*. Una vez identificados los puntos de inicio y término de las secuencias, se “quitaron” los decámeros previos y posteriores a éstos, lo que redujo ligeramente su longitud, de tal manera que el factor de elongación quedó con 658 pb, histona con 546 pb y  $\beta$ -tubulina con 539 pb.

La información generada por la secuenciación de los diferentes genes, así como la obtención de secuencias homólogas en el Genbank permitieron la construcción de árboles filogenéticos. Los resultados de los cladogramas obtenidos de los diferentes análisis practicados fueron semejantes razón por la cual se explicarán solamente los de Máxima Parsimonia. El criterio de parsimonia elige el arreglo de secuencias que pueda ser justificado con el menor número de supuestos (expresado en el número de cambios en el árbol). Los resultados de análisis son presentados a continuación para cada gen y después en forma conjunta.

#### **a) Factor de elongación**

En el alineamiento de este gen se observó que los aislamientos 16, 26, 31, 38, 43, 48 y 65 mostraban cambios en sus bases al ser comparados con el resto de los aislamientos, los cuales tenían secuencias semejantes. Los cambios encontrados

incluyen inserciones/deleciones sencillas y/o dobles de bases, además del reemplazamiento de un base por otra. La muestra con mayor número de cambios fue la 16 que corresponde al municipio de Coalcomán con 14 cambios, 1 deleción y 3 inserciones. Dentro de los cambios efectuados en las bases de las secuencias 12 fueron transiciones y 8 transversiones (Cuadros 8A, 11A). Es de llamar la atención que la secuencia del aislamiento 16 es muy parecida a la de la cepa brasileña CML283 con la cual sólo difería en 4 bases.

El análisis de parsimonia produjo 6,097,623 árboles igualmente parsimoniosos, con un índice de consistencia de 0.9494 y un índice de retención de 0.9626 (Cuadro 11A). Los clados que son comunes a la mayoría de todos los árboles se dedujeron mediante la obtención de un árbol de consenso de mayoría (Fig. 1A). En éste se puede observar que todos los aislamientos estudiados de Michoacán y las cepas brasileñas utilizadas fueron resueltos como un grupo monofilético del cual se desprendieron dos conglomerados parafiléticos, en el primero se agruparon las cepas de Brasil junto con el aislamiento 16 (Coalcomán) y en el segundo grupo todos los aislamientos restantes de Michoacán. Estos resultados confirman lo observado en las secuencias ya que el aislamiento 16 fue el más parecido a estas cepas.

## **b) Histona**

De igual manera que con el gen anterior, se observó que los aislamientos 1, 7, 41, 46, 50 y 61 tenían secuencias semejantes, mientras que los restantes presentaban algunos cambios en sus bases. Nuevamente, las muestras con mayor número de cambios fueron la 16 y 19, con seis y cinco cambios respectivamente, ambas de Coalcomán. En este gen no se presentaron inserciones de bases, sólo cuatro deleciones. Los cambios en las bases correspondieron a 13 transiciones y nueve transversiones (Cuadros 9A y 11A).

Al comparar los aislamientos de Michoacán con sus secuencias homólogas se observó que las secuencias de los aislamientos 16 y 19 eran muy parecidas a la de

la cepa MRC2802 identificada como *F. sterilihyphosum* (Steenkamp *et al.*, 2000) con la cual sólo diferían en tres y dos bases respectivamente.

El análisis de parsimonia produjo 5,816 árboles más parsimoniosos con un índice de consistencia de 0.7553 y un índice de retención de 0.7416 (Cuadro 11A). Los clados que son comunes a la mayoría de todos los árboles se dedujeron mediante la obtención de un árbol de consenso de mayoría (Fig. 2A). En éste se observó que no todos los aislamientos de Michoacán fueron resueltos satisfactoriamente a pesar de haber sido agrupados como monofiléticos. De este grupo se desprendieron tres conglomerados parafiléticos, el primero formado por aislamientos de *F. mangiferae* y *F. sterilihyphosum* de las accesiones hechas al genbank, en un segundo grupo, los aislamientos 16 y 19 fueron agrupados junto con la cepa MRC2802 de *F. sterilihyphosum*, en el tercer conglomerado quedaron los aislamientos 12, 26, 31, 38, 43, 48, 55 y 65 y finalmente el resto de los aislamientos sin resolver.

### c) $\beta$ -Tubulina

En el alineamiento de este gen, las secuencias de los aislamientos 2, 7, 26, 31, 41 y 53 mostraron cambios en sus bases al ser comparados con el resto de los aislamientos, los cuales tuvieron secuencias semejantes. Los cambios encontrados incluyeron inserciones/delecciones sencillas, además de reemplazamientos de una base por otra. El aislamiento con mayor número de cambios fue el 41 del municipio de Apatzingán. En los cambios de las bases 11 fueron transiciones y 12 transversiones (Cuadros 10A, 11A). Al comparar los aislamientos con las secuencias homólogas del Genbank, quedó a la vista que las secuencias CML 282 y CML283 eran parecidas a las secuencias de los aislamientos restantes, diferenciándose de éstas en sólo 3 bases.

El análisis de parsimonia produjo 450 árboles igualmente parsimoniosos, con un índice de consistencia de 0.9438 y un índice de retención de 0.9206 (Cuadro 11A). Los clados que son comunes a la mayoría de todos los árboles se dedujeron

mediante la obtención de un árbol de consenso de mayoría (Fig. 3A). Todos los aislamientos estudiados de Michoacán y las cepas brasileñas fueron resueltas como un grupo monofilético del cual se desprendieron tres conglomerados parafiléticos, en el primero se agruparon las cepas de Brasil CML262, CML345 y CML389; en el segundo, las cepas CML282 y CML283 fueron agrupadas, para finalmente en el tercer conglomerado quedar reunidos todos los aislamientos de Michoacán.

#### **d) Combinación de secuencias de los genes estudiados**

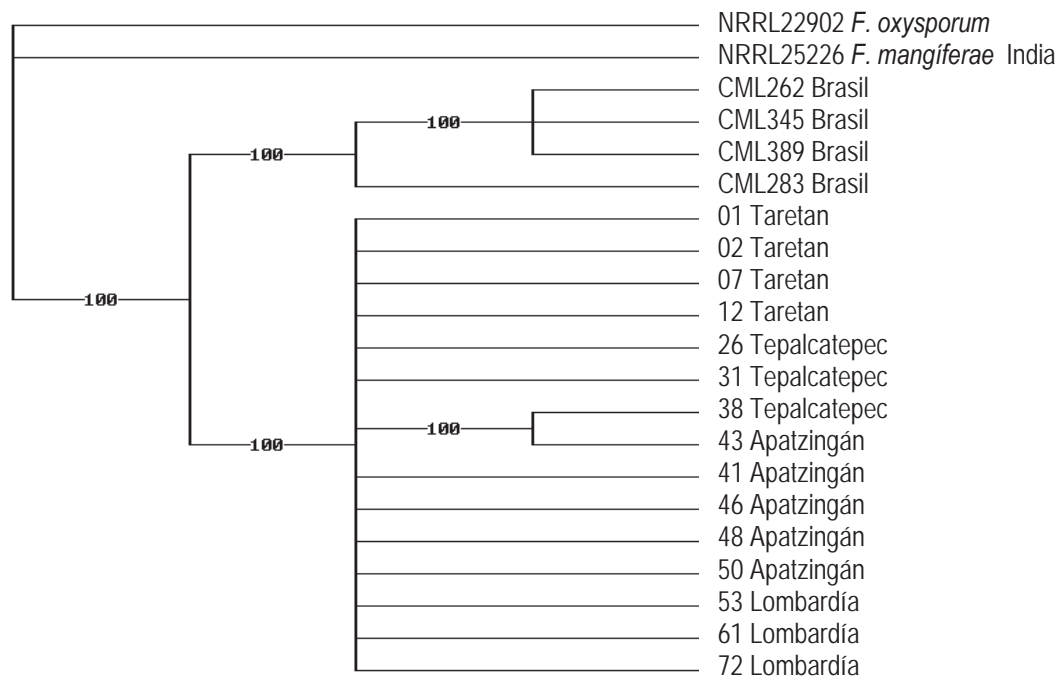
Con el fin de obtener árboles filogenéticos mejor resueltos se realizaron combinaciones entre los diferentes genes, factor de elongación e histona, factor de elongación y  $\beta$ -Tubulina, histona y  $\beta$ -Tubulina y finalmente factor de elongación, histona y  $\beta$ -Tubulina.

A través del análisis de parsimonia de la combinación de los genes del factor de elongación y  $\beta$ -Tubulina, se obtuvieron cuatro árboles igualmente parsimoniosos con un índice de consistencia de 0.9627 y un índice de retención de 0.95 (Cuadro 11A). Los clados que son comunes a la mayoría de todos los árboles se dedujeron mediante la obtención de un árbol de consenso de mayoría (Fig. 8). El dendrograma resultante mostró que los aislamientos de Michoacán fueron resueltos como un grupo monofilético hermano al clado formado por los aislamientos de Brasil. Los aislamientos CML262, CML345 y CML389 fueron resueltos en un clado hermano que compromete al aislamiento CML283.

Las secuencias provenientes del gen de  $\beta$ -Tubulina fueron más informativas en esta combinación, al proveer clados con mejor soporte y mayor número de caracteres informativos para Parsimonia, aún con el inconveniente de que los aislamientos de Coalcomán (16 y 19) y dos de Gabriel Zamora (55 y 65) no fueron secuenciados debidamente para este gen.



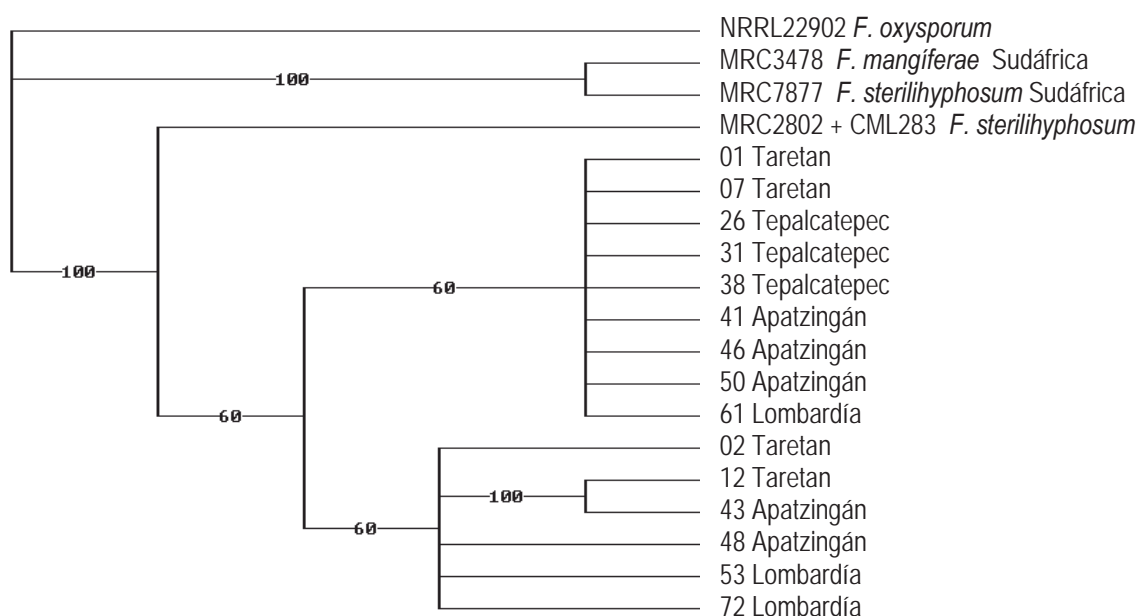
Estos resultados indican que los aislamientos de Brasil conforman un grupo monofilético con topologías similares como informaron Lima *et al.* (2009), quienes reportaron que. Los aislamientos CML262, CML345 y CML389 se agrupan juntos en un clado hermano al formado por las cepas CML283 y MRC2802, esta última identificada como *F. sterilihyphosum* (Steenkamp *et al.*, 2000), en donde ambos aislamientos poseen secuencias idénticas. Así, la mayoría de los aislamientos brasileños analizados por Lima *et al.* (2009) pertenecen a un nuevo linaje que es genéticamente distinto de *F. mangiferae* y *F. sterilihyphosum*.



**Figura 8. Consenso estricto de cuatro árboles más parsimoniosos derivados del análisis de la combinación de las secuencias de los genes del Factor de Elongación y beta-Tubulina. La probabilidad posterior Bayesiana y de parsimonia fue similar y corresponde a las ramas. Líneas sin coincidir indican clados sin resolver en el consenso estricto. NRRL National Center for Agricultural Utilization Research, Peoria, Illinois USA. CML Colecao Micológica de Lavras, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil.**

En el análisis de la combinación de los genes de histona y  $\beta$ -Tubulina, los resultados obtenidos del Consenso de mayoría (Fig. 9) de los cinco árboles más

parsimoniosos, con un índice de consistencia de 0.8922 y un índice de retención de 0.8036 (Cuadro 11A), resolvieron a los aislamientos de Michoacán como un grupo monofilético hermano a la fusión de los aislamientos MRC2802 (para histona) y CML283 (para  $\beta$ -Tubulina) identificadas como *F. sterilihyphosum*. Dos distintos clados se identificaron dentro de este grupo; en el primero se incluyeron todos los aislamientos provenientes del municipio de Tepalcatepec, mientras que el resto de los aislamientos, provenientes de los demás municipios del estado quedaron repartidos entre los dos clados.



**Figura 9. Consenso estricto de cinco árboles más parsimoniosos derivados del análisis de la combinación de las secuencias de los genes de Histona y beta-Tubulina. NRRL, National Center for Agricultural Utilization Research, Peoria, Illinois USA. MRC, Culture collection of the Medical Research Council, Tygerberg, South Africa.**

Las secuencias obtenidas del gen de histona fueron las más informativas para esta combinación al proveer clados con mejor soporte y mayor número de caracteres informativos para Parsimonia.

Estos resultados difieren de los reportados por Steenkamp *et al.* (2000), quienes indican que los aislamientos MRC7877 y MRC2802 de *F. sterilihyphosum* provenientes de Sudáfrica, se agrupan juntos en un mismo clado, situación que no se presenta en este estudio al resolverse en clados diferentes. De igual manera, los aislamientos MRC3478 (*F. mangiferae*) y MRC7877 fueron resueltos en un mismo clado. Esta situación sugiere la necesidad de realizar más estudios que permitan una distinción más precisa entre las especies.

El análisis de parsimonia produjo 6,995,721 árboles igualmente parsimoniosos para la combinación de factor de elongación e histona con un índice de consistencia de 0.9538 y un índice de retención de 0.8966 (Cuadro 11A). En el consenso de mayoría (Fig. 4A), se observó que todos los aislamientos de Michoacán con excepción del 16 se resolvieron como un grupo monofilético repartido en tres clados. El aislamiento 16 de Coalcomán se agrupó en un clado hermano al de los aislamientos estudiados con la cepa CML283 de Brasil. Estos resultados reafirman los obtenidos en los cladogramas individuales de cada gen al observar la semejanza de sus secuencias.

En el análisis de la combinación de las secuencias de los tres genes de los aislamientos de *Fusarium* asociados a tejidos malformados del mango presentes en Michoacán, se obtuvieron 7,793,471 árboles más parsimoniosos, con un índice de consistencia de 0.9627 y un índice de retención de 0.8696 (Cuadro 11A). Los clados que son comunes a la mayoría de todos los árboles se dedujeron mediante la obtención de un árbol de consenso de mayoría (Fig. 5A). En este cladograma se observó que todos los aislamientos de Michoacán conformaron un grupo monofilético distribuido en dos conglomerados hermanos a la fusión de las cepas CML283 y MRC2802. Los resultados individuales de los genes y sus combinaciones se confirman con los obtenidos en esta última combinación.

La variación en las bases de las secuencias de los tres genes de los aislamientos de Michoacán comparados con las cepas obtenidas genbank (Cuadros 8A, 9A, y 10A), mostraron que existen diferencias claras que los distancian filogenéticamente de *F. mangifera*, especie causal de la malformación en mango (Britz *et al.*, 2002; Zheng y Ploetz, 2002; Iqbal *et al.*, 2006; Leslie y Summerell, 2006; Marasas *et al.*, 2006, Kvas *et al.*, 2007; y Lima *et al.*, 2009).

Al comparar las bases en las secuencias de los aislamientos estudiados con las de *F. sterilihyphosum* (Britz *et al.*, 2002; Zheng y Ploetz, 2002; Iqbal *et al.*, 2006; Leslie y Summerell, 2006; Marasas *et al.*, 2006; Lima *et al.*, 2009) o de *Fusarium* sp reportado en Brasil por Lima *et al.* (2009), especies causales también de la malformación, y tomando en cuenta los tres genes utilizados, se podría considerar que la mayoría de los aislamientos de Michoacán (a excepción de los aislamientos 16 y probablemente 19 provenientes de Coalcomán) pertenecen a un taxón diferente, lo que confirma lo reportado previamente por Rodríguez-Alvarado *et al.*, (2008). Sin embargo, este estudio hace evidente la necesidad de contar con un mayor número de muestras y un análisis multigénico que permitan distinguir con precisión cada aislamiento, ya que el análisis cultural y morfológico no permite distinguir con exactitud nuevos taxones involucrados en la malformación de mango.

## V. CONCLUSIONES

De acuerdo con la metodología utilizada al abordar los objetivos e hipótesis planteados para esta investigación y en base a los resultados obtenidos, se concluyó lo siguiente:

1. Los resultados de esta investigación comprobaron la hipótesis planteada.
2. Los aislamientos de *Fusarium* obtenidos de tejido de mango con malformación vegetativa o en inflorescencia en los municipios del estado de Michoacán, presentaron variación morfológica y genética.
3. De acuerdo a los resultados morfológicos, genéticos y filogenéticos observados, en la región de Michoacán se encuentra presente un taxón diferente a las especies de *F. oxysporum*, *F. mangiferae* y *F. sterilihyphosum*.
4. El análisis de las secuencias amplificadas de los genes factor de elongación, histona y  $\beta$ -Tubulina nucleares de los aislamientos de *Fusarium*, indicó la presencia de algunos polimorfismos entre los aislamientos.

## VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar, R. J. M. 2002. **Especiación recombinacional y relaciones filogenéticas en *Satureja macrostema* var. *Laevigata***. Tesis Doctoral. Universidad de Colima, México. 156 p.
- Altekar G., S. Dwarkadas, J. P. Huelsenbeck and F. Ronquist. 2004. **Parallel metropolis coupled Markov chain Monte Carlo for Bayesian phylogenetic inference**. *Bioinformatics*. 20(3): 407-415.
- Alves M. F., B. Ramos, M. A. García-Sánchez, A. P. Eslava y J. M. Díaz-Minguez. 2002. **A DNA-based procedure for in plant detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli***. *Phytopathology*. 92: 237-244.
- Barnett, H.L. y Hunter B. B. 1998. **Illustrated Genera of Imperfect Fungi**. 4th ed. Burgess Publishing Company. Minneapolis, Minnesota. USA. 227p.
- Bindra, O. S. and D. R. C. Bakhetia. 1971. **Investigation on the etiology and control of mango malformation**. *Indian J. Hortic.* 28:80-85.
- Britz, H., T. A. Coutinho, M. J. Wingfield, W. F. O. Marasas, T. R. Gordon and J. F. Leslie. 1999. ***Fusarium subglutinans* f. sp. *pini* represents a distinct mating population in the *Gibberella fujikuroi* species complex**. Applied Environmental. *Microbiology* 65:1198-1201.
- Britz, H., E. T. Steenkamp, T. A. Coutinho, B. D. Wingfield, W. F. O. Marasas and M. J. Wingfield. 2002. **Two new species of *Fusarium* section *Liseola* associated with mango malformation**. *Mycology* 94: 722-730.
- Calle B. J. 2005 **Caracterización morfológica y molecular de hongos fitopatógenos de suelo e identificación de bacterias foliares en el cultivo de cebolla**. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad de Puerto Rico. 127 p.
- Chávez, C. X., P. A. Vega, L. M. Tapia V. y S. M. A. Miranda. 2001. **Mango, su manejo y producción en el trópico seco de México**. INIFAP. SAGARPA. 109p.
- Chávez, M. 1994. **El cultivo del mango**. In: Tecnología de producción del mango. INIFAP-CIPAC. pp 2-6.
- Covarrubias, A. R. 1978. **Pruebas de patogenicidad de *Fusarium* sp. Deformación floral y vegetativa del mango**. CEEIF. CONAFRUT. (Xalapa, Ver.) 44: 84-52.

- Crane J. H. y C. W. Campbell. 1995. **El mango en Florida**. University of Florida. IFAS extensión. USA. 8 p.
- De Luna E., J. A. Guerrero y T. Chef-Taracena. 2005. **Sistemática biológica: avances y direcciones en la teoría y los métodos de la reconstrucción filogenética**. *Hidrobiológica* 15(3): 351-370.
- Díaz-Balderas, V. y S. Romero-Cova. 1980. **Etiología de la deformación o escoba de bruja del mango en el estado de Morelos**. *Agrociencia* 39: 35-40.
- FAOSTAT. 2005. <http://apps.fao.org/lim500/nph-wrap.plFAOSTATDatabase/>
- Freeman, S., M. Maimon and Y. Pinkas. 1999. **Use of GUS transfromants of *Fusarium subglutinans* for determining etiology of mango malformation disease**. *Phytopathology* 89:456-461.
- Garcés de Granada, E., M. Orozco de Amézquita, G. R. Bautista y H. Valencia. 2001. ***Fusarium oxysporum* el hongo que nos falta conocer**. *Acta Biol. Colombiana*. 1(6): 1-20
- Glass, N. L. and Donaldson, G. C. 1995. **Development of primer sets designed for use with PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes**. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1323-1330.
- Hake S. B. C. D. and Allis. 2006. **Histone H3 variants and their potential role in indexing mammalian genomes: The “H3 barcode hypothesis”**. The Rockefeller University, New York, NY. 8 p.
- Hall, T. A. (1999). **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT**. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98.
- Huelsenbeck, J. P. and F. Ronquist. 2001. **MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny**. *Bioinformatics* 17: 754-755.
- Ibrahim, A. N., M. M. Satour, Z. M. El-Tobshy and M. A. Abdel Sattar. 1975. **Pathological and histological note on mango malformation in Egypt**. *Curr. Sci.* 44:443-444.
- Iqbal Z., Mehboob-ur-Rahman, A. Altaf Dasti, Ahmad Saleem and Yusuf Zafar. 2006. **RAPD analysis of *Fusarium* isolates causing “Mango Malformation” disease in Pakistan**. *Microbiol Biotechnol* 22:1161–1167.
- Kumar, J. and S. P. S. Beniwal. 1992. **Mango malformation**. In: **Plant Diseases of International Importance**. Ed. J. Kumar, H. S. Chaube, U. S. Singh, A. N. Mukhopadhyay. Prentice Hall. New York. 456 pp.

- Kumar, J., U. S. Singh and S. P. S. Beniwal. 1993. **Mango malformation: one hundred years of research.** *Annu. Rev. Phytopathol* 31: 217-232.
- Kvas M., E. T. Steenkamp, A. O. Al Adawi, M. L. Deadman, A. A. Jahwari, W. F. O. Marasas, B. D. Wingfield, R. C. Ploetz and M. J. Winfield. 2007. ***Fusarium mangiferae* associated with mango malformation in the Sultanate of Oman.** *Plant Pathol.* DOI 10.1007/s10658-007-9231-8.
- Leslie, J. F. 1995. ***Gibberella fujikuroi*: available populations and variable traits.** *Can. J. Bot.* 73:S282-291.
- Leslie, J. F. and B. A. Summerell. 2006. **The *Fusarium* laboratory Manual.** Blackwell Publishing. Iowa, USA.
- Lima, C.S., L. H. Pfenning, S. S. Costa, M. A. Campos and J. F. Leslie. 2009. **A new *Fusarium* lineage within the *Gibberella fujikuroi* species complex is the main causal agent of mango malformation disease in Brazil.** *Plant Pathol.* 58: 33-42.
- Mahuku, G. S. 2004. **A simple extraction method suitable for PCR- based analysis of plant, fungal, and bacterial DNA.** *Plant Mol. Biol. Rep.* 22: 71-81.
- Manicom, B. Q. 1989. **Blossom malformation of mango.** *South African Mango Grower's Association Yearbook* 10: 11-12.
- Marasas, W. F. O., R. C. Ploetz, M. J. Wingfield, B.D. Wingfield and E. T. Steenkamp. 2006. **Mango malformation disease and the associated *Fusarium* species.** *Phytopathology* 96: 667-672.
- Martin R. R., J. Delano y C. A. Levesque. 2000. **Impacts of molecular diagnostic technologies on plant disease management.** *Annu. Rev. Phytopathol.* 38:207-239.
- Mora-Aguilera, A., O. D. Téliz, G. Mora-Aguilera, P. Sanchez-García, J. Javier-Mercado. 2003. **Progreso temporal de "escoba de bruja" (*Fusarium oxysporum* y *F.subglutinans*) en huertos de mango (*Mangifera indica* L.) cv. Haden en Michoacán, México.** *Rev. Mex. Fitopatol.* 21:1-12.
- Myung-Hyun J., K. Jungmok, K. Satish, H. Jin-Wook, Y. Han-Sang, K. Jinheung, K. Bon-sung, K. Sung-Kun and Y. Moon-Young. Cloning. 2008. **Purification, and Polymerization of *Capsicum annuum* Recombinant and Tubulin.** *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72 (4), 1048–1055.
- Narasimhan, M. J. 1954. **Malformation of panicles in mango incited by *Eriophyes*.** *Curr. Sci.* 23: 297-298.



- Nei M. y S. Kumar. 2000. **Molecular evolution and phylogenetics**. Oxford University Press, New York.
- Noriega, C. D. H. 1996. **“Escoba de bruja” del mango: etiología, histopatología, epidemiología y manejo integrado**. Tesis Doctoral. Colegio de Postgraduados. Montecillos, México. 72 p.
- Noriega, C. D., J. A. Rodríguez, N. Marban-Mendoza y L. G. Zarate. 1988. **Efecto de productos químicos sobre fitonematodos asociados a la raíz y el ácaro *E. mangiferae* (Sayed) involucrado en la “escoba de bruja” del mango (cv. Haden) en Iguala, Gro., Mexico**. *Rev. Mex. Fitopatol.* 6: 61-72.
- Nylander, J. A. A., F. Ronquist, J. P. Huelsenbeck and J. L. N. Aldrey. 2004. **Bayesian Phylogenetic Analysis of Combined Data**. *Syst. Biol.* 53(1):47–67
- O'Donnell, K. and E. Cigelnik. 1997. **Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous**. *Mol. Phylogenet. Evol.* 7, 103–106.
- O'Donnell, K., E. Cigelnik and H. I. Nirenberg. 1998. **Molecular systematic and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex**. *Mycologia* 90:465-493.
- O'Donnell, K., H. I. Nirenberg, T. Aoki and E. Cigelnik. 2000. **A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: detection of additional phylogenetically distinct species**. *Mycoscience* 41:61-78.
- Parrotta, J. A. 1993. ***Mangifera indica* L. Mango**. SO-ITF-SM-63. New Orleans, LA. U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station, p. 6
- Pinkas, Y. and S. Gazit. 1992. **Mango malformation-control strategies**. 4th International Mango Symposium, Miami 5-10 July (Abstr.), p. 17.
- Ploetz, R. C. 1993. **Distribution and prevalence of *Fusarium subglutinans* in mango trees affected by malformation**. *Can. J. Bot.* 72: 7-9.
- Ploetz, R. C. 2003. **Diseases of Mango**. *In: Diseases of Tropical Fruit Crops*, ed. R. C. Ploetz. CABI Publishing. Cambridge, USA.
- Ploetz, R. C. 2007. **Diseases of Tropical Perennial Crops. Challenging Problems in Diverse Environments**. *Plant Dis.* 91:6.
- Ploetz, R. C. and N. Gregory. 1993. **Mango malformation in Florida: distribution of *Fusarium subglutinans* in affected trees, and relationships within and among strains from different orchards**. *Acta Hort.* 341:388-394.

- Ploetz, R. C. and O. Prakash. 1997. **Foliar, floral and soil borne diseases**. In: Litz, R. E. (ed.) **The Mango: Botany, Production and Uses**. CAB International, Wallingford, UK, pp. 281-326.
- Posada, D. and K. A. Crandall. 1998. **ModelTest: testing the model of DNA substitution**. *Bioinformatics* 14: 817-818.
- Ramírez, M. L., S. N. Chulze and N. Magan. 2004. **Impact of osmotic and matrix water stress on germination, growth, mycelial water potentials and endogenous accumulation of sugars and sugar alcohols in *Fusarium graminearum***. *Mycologia*, 96(3): 470–478.
- Raychaudhuri, S. P. 1992. **Mango malformation**. 4th International Mango Symposium, Miami 5-10 July (Abstr.), p. 126.
- Robaglia C. and C. Caranta. 2006. **Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection**. *Trends in Plant Science* Vol.11 No.1 January.
- Rodríguez-Alvarado, G., S. Fernández-Pavía, R. C. Ploetz. 2008. **A *Fusarium* sp. different from *Fusarium oxysporum* and *F. mangiferae* is associated with mango malformation in Michoacán, México**. *Plant Pathology* 57, 781.
- Ronquist F. 2004. **Bayesian inference of character evolution**. *Phylogenetics Series*. 19:9. USA.
- Sabadell, G. S. 2003. **Pathogenicity of fungal species associated with false Panama disorder of banana in the Canary islands**. In 2nd International symposium on *Fusarium* wilt on banana. Salvador de Bahia, Brazil. Ed. Embrapa. pp:111-118.
- SAGARPA. 2006. [http://www.siap.sagarpa.gob.mx/ar\\_comagr2c.html](http://www.siap.sagarpa.gob.mx/ar_comagr2c.html). (Revisado el día 6 de Octubre 2006).
- Steenkamp, E. T., B.D. Wingfield, T. A. Coutinho, M.J. Wingfield. and W. F. O. Marasas. 1999a. **Differentiation of *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini*. By histone gene sequence data**. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3401-3406.
- Steenkamp, E. T., H. Britz, T. A. Coutinho, B. D. Wingfield, W. F. O. Marasas and M. J. Wingfield. 2000. **Molecular characterization of *Fusarium subglutinans* associated with mango malformation**. *Mol. Plant Pathol.* 1(3):187-193.
- Sternlicht, M. and S. Goldenberg. 1976. Mango eriophyd mites in relation to inflorescence. *Phytoparasitica* 4: 45-50.
- Summanwar, A. S., S. P. Raychoudhuri and S. C. Pathak. 1966. **Association of the fungus *Fusarium* sp. Sheld. with the malformation in mango**. *Indian Phytopathol.* 19:227-228.

- Summerell, B. A., B. Salleh and J. F. Leslie. 2003. **A utilitarian approach to *Fusarium* identification.** *Plant Disease* 87(2): 117-128.
- Swofford, D. L. 2003. **PAUP\*. Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods).** v.4.0b10. Sinaur Associates. Sunderland, Massachusetts.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins and T. J. Gibson. (1994). **CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice.** *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Varma, A., S. P. Raychoudhuri, V. C. Lele and A. Ram. 1974. **Towards the understanding of the problem of malformation of mango (*Mangifera indica*).** *Proc. Indian Natl. Sci. Acad.* 37:291-300.
- Vega, P. A. y S. M. Miranda. 1993. **Distribución, incidencia y severidad de la escoba de bruja del mango (*Mangifera indica* L.) en el Valle de Apatzingan, Michoacán.** *Rev. Mex. Fitopatol.* 11:1-4.
- Wahba, M. L., M. A. El Enany. and A. M. Farrag. 1986. **Five mango varieties as affected by malformation phenomenon and bud mite infestation in Egypt.** *Agric. Res. Rev.* 61: 193-201.
- Zheng, Q. and R. Ploetz. 2002. **Genetic diversity in the mango malformation pathogen and development of a PCR assay.** *Plant Pathol.* 51:208-216.

## VII. APÉNDICE

**Cuadro 1A. Datos de colecta de tejido malformado de mango obtenidos en cinco municipios de Michoacán con alta incidencia de la enfermedad.**

Código de Campo	Código de Laboratorio	Colecta No.	Fecha de Colecta	Municipio	Huerta	Árbol No.	Tipo de Tejido Malformado
C10 S1 S1 F1	1	10	28-Abr-07	Taretan	1	1	Floral
C10 S1 S2 V1	2	10	28-Abr-07	Taretan	1	2	Vegetativo
C10 S1 S3 V1	3	10	28-Abr-07	Taretan	1	3	Vegetativo
C10 S2 S1 F1	4	10	28-Abr-07	Taretan	2	1	Floral
C10 S2 S2 V1	5	10	28-Abr-07	Taretan	2	2	Vegetativo
C10 S2 S2 F1	6	10	28-Abr-07	Taretan	2	2	Floral
C10 S2 S3 V1	7	10	28-Abr-07	Taretan	2	3	Vegetativo
C10 S2 S3 F1	8	10	28-Abr-07	Taretan	2	3	Floral
C10 S3 S1 V1	9	10	28-Abr-07	Taretan	3	1	Vegetativo
C10 S3 S1 F1	10	10	28-Abr-07	Taretan	3	1	Floral
C10 S3 S2 V1	11	10	28-Abr-07	Taretan	3	2	Vegetativo
C10 S3 S2 F1	12	10	28-Abr-07	Taretan	3	2	Floral
C10 S3 S3 V1	13	10	28-Abr-07	Taretan	3	3	Vegetativo
C10 S3 S3 F1	14	10	28-Abr-07	Taretan	3	3	Floral
C11 S1 S1 V1	15	11	12-May-07	Coalcomán	4	1	Vegetativo
C11 S1 S3 F1	16	11	12-May-07	Coalcomán	4	3	Floral
C11 S2 S1 F1	17	11	12-May-07	Coalcomán	5	1	Floral
C11 S2 S1 F2	18	11	12-May-07	Coalcomán	5	1	Floral
C11 S2 S2 V1	19	11	12-May-07	Coalcomán	5	2	Vegetativo
C11 S2 S3 F1	20	11	12-May-07	Coalcomán	5	3	Floral
C11 S2 S4 F1	21	11	12-May-07	Coalcomán	5	4	Floral
C11 S2 S5 F1	22	11	12-May-07	Coalcomán	5	5	Floral
C11 S2 S5 F2	23	11	12-May-07	Coalcomán	5	5	Floral
C11 S3 S1 F1	24	11	12-May-07	Tepalcatepec	6	1	Floral
C11 S3 S3 F1	25	11	12-May-07	Tepalcatepec	6	3	Floral
C11 S3 S4 F1	26	11	12-May-07	Tepalcatepec	6	4	Floral
C11 S4 S1 V1	27	11	12-May-07	Tepalcatepec	7	1	Vegetativo
C11 S4 S1 F1	28	11	12-May-07	Tepalcatepec	7	1	Floral
C11 S4 S1 F2	29	11	12-May-07	Tepalcatepec	7	1	Floral
C11 S4 S2 F1	30	11	12-May-07	Tepalcatepec	7	2	Floral

Continuación.....Cuadro 1A

Código de Campo	Código de Laboratorio	Colecta No.	Fecha de Colecta	Municipio	Huerta	Árbol No.	Tipo de Tejido Malformado
C11 S4 S3 V1	31	11	12-May-07	Tepalcatepec	7	3	Vegetativo
C11 S4 S3 F1	32	11	12-May-07	Tepalcatepec	7	3	Floral
C11 S5 S1 V1	33	11	12-May-07	Tepalcatepec	8	1	Vegetativo
C11 S5 S1 F1	34	11	12-May-07	Tepalcatepec	8	1	Floral
C11 S5 S2 V1	35	11	12-May-07	Tepalcatepec	8	2	Vegetativo
C11 S5 S2 F1	36	11	12-May-07	Tepalcatepec	8	2	Floral
C11 S5 S2 F2	37	11	12-May-07	Tepalcatepec	8	2	Floral
C11 S5 S3 F1	38	11	12-May-07	Tepalcatepec	8	3	Floral
C11 S5 S3 F2	39	11	12-May-07	Tepalcatepec	8	3	Floral
C11 S6 S1 V1	40	11	12-May-07	Apatzingán	9	1	Vegetativo
C11 S6 S2 V1	41	11	12-May-07	Apatzingán	9	2	Vegetativo
C11 S6 S2 F1	42	11	12-May-07	Apatzingán	9	2	Floral
C11 S6 S3 F1	43	11	12-May-07	Apatzingán	9	3	Floral
C11 S7 S2 V1	44	11	12-May-07	Apatzingán	10	2	Vegetativo
C11 S6 S4 F1	45	11	12-May-07	Apatzingán	9	4	Floral
C11 S7 S1 V1	46	11	12-May-07	Apatzingán	10	1	Vegetativo
C11 S7 S1 F1	47	11	12-May-07	Apatzingán	10	1	Floral
C11 S7 S3 F1	48	11	12-May-07	Apatzingán	10	3	Floral
C11 S8 S1 F1	49	11	12-May-07	Apatzingán	11	1	Floral
C11 S8 S2 F1	50	11	12-May-07	Apatzingán	11	2	Floral
C11 S8 S3 V1	51	11	12-May-07	Apatzingán	11	3	Vegetativo
C11 S8 S3 F1	52	11	12-May-07	Apatzingán	11	3	Floral
C12 S1 S1 F1	53	12	01-Jul-07	G. Zamora	12	1	Floral
C12 S1 S1 F2	54	12	01-Jul-07	G. Zamora	12	1	Floral
C12 S1 S2 F1	55	12	01-Jul-07	G. Zamora	12	2	Floral
C12 S1 S2 F2	56	12	01-Jul-07	G. Zamora	12	2	Floral
C12 S1 S3 V1	57	12	01-Jul-07	G. Zamora	12	3	Vegetativo
C12 S1 S3 V2	58	12	01-Jul-07	G. Zamora	12	3	Vegetativo
C12 S2 S1 V1	59	12	01-Jul-07	G. Zamora	13	1	Vegetativo
C12 S2 S1 V2	60	12	01-Jul-07	G. Zamora	13	1	Vegetativo
C12 S2 S2 V1	61	12	01-Jul-07	G. Zamora	13	2	Vegetativo
C12 S2 S2 V2	62	12	01-Jul-07	G. Zamora	13	2	Vegetativo
C12 S2 S3 V1	63	12	01-Jul-07	G. Zamora	13	3	Vegetativo

Continuación.....Cuadro 1A

Código de Campo	Código de Laboratorio	Colecta No.	Fecha de Colecta	Municipio	Huerta	Árbol No.	Tipo de Tejido Malformado
C12 S2 S3 V2	64	12	01-Jul-07	G. Zamora	13	3	Vegetativo
C12 S2 S4 V1	65	12	01-Jul-07	G. Zamora	13	4	Vegetativo
C12 S2 S4 V2	66	12	01-Jul-07	G. Zamora	13	4	Vegetativo
C12 S2 S4 F1	67	12	01-Jul-07	G. Zamora	13	4	Floral
C12 S2 S4 F2	68	12	01-Jul-07	G. Zamora	13	4	Floral
C12 S3 S1 F1	69	12	01-Jul-07	G. Zamora	14	1	Floral
C12 S3 S1 F2	70	12	01-Jul-07	G. Zamora	14	1	Floral
C12 S3 S2 F1	71	12	01-Jul-07	G. Zamora	14	2	Floral
C12 S3 S2 F2	72	12	01-Jul-07	G. Zamora	14	2	Floral
C12 S3 S3 V1	73	12	01-Jul-07	G. Zamora	14	3	Vegetativo
C12 S3 S3 V2	74	12	01-Jul-07	G. Zamora	14	3	Vegetativo
C12 S3 S3 F1	75	12	01-Jul-07	G. Zamora	14	3	Floral
C12 S3 S3 F2	76	12	01-Jul-07	G. Zamora	14	3	Floral

**Cuadro 2A. Coordenadas de las huertas de donde se colectó el material con malformación vegetativa y floral en mango**

Coordenadas de Sitio y/o Huerta	
Huerta 1	N 19° 20.094 W 101° 55.292
Huerta 2	N 19° 20.094 W 101° 55.292
Huerta 3	N 19° 21.880 W 101° 55.713
Huerta 4	N 18° 46.438 W 103° 09.624
Huerta 5	N 18° 48.721 W 103° 08.649
Huerta 6	N 19° 06.432 W 102° 52.630
Huerta 7	N 19° 06.908 W 102° 52.357
Huerta 8	N 19° 11.151 W 102° 33.607
Huerta 9	N 19° 11.151 W 102° 33.607
Huerta 10	N 19° 08.214 W 102° 32.823
Huerta 11	N 19° 07.416 W 102° 32.521
Huerta 12	N 19° 08.797 W 102° 03.189
Huerta 13	N 19° 08.742 W 102° 03.345
Huerta 14	N 19° 08.628 W 102° 03.211

**Cuadro 3A. Características morfológicas de macroconidios en medio de cultivo CLA (Hojas de clavel-agar)**

<b>Código de laboratorio</b>	<b>Rango de la longitud (µm) (promedio)</b>	<b>Rango de ancho (µm) (promedio)</b>
1	26.4-43.2 (33.6)	3.12-4.08 (3.58)
2	24-55.2 (34.56))	3.12-4.8 (3.74)
5	31.2-48 (40.32)	3.12-3.6 (3.54)
7	26.4-50.4 (37.73)	3.12-4.08 (3.54)
9	31.2-55.2 (43.49)	4.08-4.8 (4.17)
12	36-48 (41.95)	3.6-4.08 (3.83)
15	38.4-60 (45.31)	3.6-4.08 (3.81)
16	33.6-52.8 (41.86)	3.6-4.08 (4.0)
19	33.6-62.4 (41.38)	3.6-4.08 (3.91)
22	31.2-48 (35.62)	3.6-4.08 (3.81)
24	28.8-48 (39.55)	3.6-4.08 (3.81)
26	31.2-55.2 (44.93)	3.6-4.08 (3.89)
29	27.5 a 80 (34.46)	3.12-3.6 (3.54)
31	36-57.6 (46.18)	2.5 a 5 (3.54)
35	26.4-52.8 (38.69)	2.4-4.08 (3.44)
38	36-55.2 (42.34)	3.12-3.6 (3.52)
41	38.4-79.2 (57.5)	3.12-4.08 (3.68)
43	43.2-67.2 (58.18)	3.6-4.08 (3.98)
46	33.6-57.6 (42.53)	3.6-4.08 (3.87)
48	38.4-69.6 (48.96)	3.6-4.08 (3.91)
50	33.6-55.2 (42.82)	3.12-4.08 (3.89)
52	38.4-57.6 (47.42)	3.6-5.52 (4.3)
53	27.5-80 (49.15)	3.6-4.08 (3.7)
55	40.8-69.6 (52.03)	3.12-4.08 (3.58)
61	36-57.6 (48.0)	3.6-4.08 (3.7)
65	43.2-62.4 (50.4)	3.6-4.8 (4.04)
70	38.4-48 (43.87)	3.6-4.08 (3.77)
72	36-64.8 (51.07)	3.6-4.08 (3.87)

**Cuadro 4A. Características morfológicas de microconidios en medio de cultivo CLA (Hojas de clavel-agar)**

<b>Código de laboratorio</b>	<b>Rango de la longitud (µm) (promedio)</b>	<b>Rango de ancho (µm) (promedio)</b>
1	7.2-12 (10.08)	2.4-3.6 (3.23)
2	7.2-12 (9.89)	3.12-4.08 (3.52)
5	9.6-14.4 (11.14)	2.4-4.08 (3.27)
7	9.6-14.4 (10.9)	3.12-4.08 (3.6)
9	7.2-14.4 (11.04)	3.12-3.6 (3.46)
12	7.2-12 (9.07)	3.12-3.6 (3.39)
15	7.2-12 (9.12)	3.12-3.6 (3.45)
16	8.4-14.4 (10.56)	3.12-3.6 (3.37)
19	8.4-14.4 (10.18)	3.12-4.08 (3.52)
22	7.2-16.8 (12)	3.12-3.6 (3.33)
24	7.2-14.4 (9.02)	3.12-3.6 (3.37)
26	4.8-12 (8.06)	2.4-3.6 (3.09)
29	8.4-14.4 (10.75)	2.4-3.6 (3.23)
31	8.4-14.4 (11.23)	2.4-3.6 (3.15)
35	7.2-12 (9.5)	2.4-3.6 (2.89)
38	7.2-14.4 (9.89)	2.4-3.6 (3.23)
41	6-12 (9.22)	2.4-4.08 (3.29)
43	6-14.4 (8.64)	2.4-3.6 (3.29)
46	7.2-12 (9.31)	3.12-3.6 (3.43)
48	7.2-14.4 (10.7)	3.12-4.08 (3.54)
50	7.2-16.8 (10.9)	3.12-4.08 (3.64)
52	8.4-14.4 (11.04)	2.4-4.08 (3.26)
53	8.4-14.4 (11.42)	2.4-3.6 (3.21)
55	7.2-14.4 (10.13)	3.12-3.6 (3.47)
61	7.2-16.8 (11.04)	2.4-4.08 (3.57)
65	8.4-16.8 (11.57)	3.12-4.08 (3.48)
70	7.2-14.4 (10.75)	3.12-4.08 (3.5)
72	7.2-14.4 (10.03)	3.12-4.08 (3.52)



**Cuadro 5A. Tasa de crecimiento micelial de *Fusarium* spp a 25 °C por 72 h en medio PDA**

Código de laboratorio	Rango (mm)	Promedio (mm) 72 h	Promedio (mm) 24 h
1	29-32.5	30.17	10.06
2	24-25.5	24.83	8.28
5	28-29.5	28.67	9.56
7	30-32	30.67	10.22
9	24-25	24.67	8.22
12	20.5-22.5	21.83	7.28
15	27-28	27.5	9.17
16	27.5-29	28.5	9.5
19	25.5-26.5	25.83	8.61
22	27-29.5	28.5	9.5
24	28.5-29	28.83	9.61
26	31.5-32.5	31.75	10.67
29	29-30	29.5	9.83
31	30.5	30.5	10.17
35	29-30	29.5	9.83
38	29-30.5	29.83	9.94
41	28-29	28.67	9.56
43	23	23	7.67
46	25-26	25.67	8.56
48	22-23	22.5	7.5
50	28.5-29.5	28.83	9.61
52	29.5-32	30.83	10.28
53	20	20	6.67
55	28-28.5	28.17	9.39
61	28.5-29	28.83	9.61
65	25.5-26.5	26	8.67
70	26-27.5	26.67	8.89
72	25.5-28	26.67	8.89

**Cuadro 6A. Análisis de varianza para el efecto del municipio sobre el largo del macroconidio de *Fusarium* spp.**

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	Pr>F
largo de macroconidio	27	27663.4285	1024.5714	25.18	<.0001
Error	672	27342.0288	40.6875		
Total	699	55005.4573			

C.V.= 14.4748  $r^2=0.5029$

**Cuadro 7A. Análisis de varianza para el efecto crecimiento de *Fusarium* spp**

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	Pr>F
crecimiento	27	79.8962	2.9591	41.07	<.0001
Error	56	4.0344	0.0720		
Total	83	83.9306			

C.V.=2.2734  $r^2=0.9908$

**Cuadro 8A. Posición de los cambios en las bases en las secuencias del gen del factor de elongación de los aislamientos obtenidos de tejido malformado de mango.**

Número de Aislamiento	Posición de los cambios en las bases																											
	50	56	57	72	81	96	97	99	111	112	114	116	139	140	142	171	172	184										
1	A	C	G	T	C	-	-	C	-	-	T	A	-	-	T	-	-	A										
2	A	C	G	T	C	-	-	C	-	-	T	A	-	-	T	-	-	A										
7	A	C	G	T	C	-	-	C	-	-	T	A	-	-	T	-	-	A										
12	A	C	G	T	C	A	G	C	A	T	T	A	-	-	T	-	-	A										
16	T	C	T	T	T	-	-	C	-	-	A	C	-	-	C	-	-	G										
19	A	C	G	T	C	-	-	C	-	-	T	A	-	-	T	-	-	A										
26	A	C	G	T	C	-	-	C	-	-	T	A	G	C	T	-	-	A										
31	A	C	G	T	C	-	-	C	-	-	T	A	-	-	T	-	-	A										
38	A	C	G	T	C	-	-	C	-	-	T	A	-	-	T	T	G	A										
41	A	C	G	T	C	-	-	C	-	-	T	A	-	-	T	-	-	A										
43	A	C	G	T	C	-	-	C	-	-	T	A	-	-	T	-	-	A										
46	A	C	G	T	C	-	-	C	-	-	T	A	-	-	T	-	-	A										
48	A	C	G	-	C	-	-	C	-	-	T	A	-	-	T	-	-	A										
50	A	C	G	T	C	-	-	C	-	-	T	A	-	-	T	-	-	A										
53	A	C	G	T	C	-	-	C	-	-	T	A	-	-	T	-	-	A										
55	A	C	G	T	C	-	-	C	-	-	T	A	-	-	T	-	-	A										
61	A	C	G	T	C	-	-	C	-	-	T	A	-	-	T	-	-	A										
65	A	C	G	T	C	-	-	T	-	-	T	A	-	-	T	-	-	A										
72	A	C	G	T	C	-	-	C	-	-	T	A	-	-	T	-	-	A										
<i>F. sterilihyphosum</i>	T	T	T	T	T	-	-	C	-	-	A	C	-	-	C	-	-	A										
<i>Fusarium de Brasil</i>	T	T	T	T	T	-	-	C	-	-	A	C	-	-	C	-	-	A										

Continuación.....Cuadro 8A

Número de Aislamiento	Posición de los cambios en las bases																			
	200	231	240	241	282	295	299	312	332	364	365	366	372	381	391	400				
1	G	G	-	-	C	A	C	G	-	C	C	-	T	T	C	T				
2	G	G	-	-	C	A	C	G	-	C	C	-	T	T	C	T				
7	G	G	-	-	C	A	C	G	-	C	C	-	T	T	C	T				
12	G	G	-	-	C	A	C	G	-	C	C	-	T	T	C	T				
16	G	A	C	G	C	G	C	G	-	T	G	C	T	-	T	T				
19	G	G	-	-	C	A	C	G	-	C	C	-	T	T	C	T				
26	G	G	-	-	C	A	C	G	-	C	C	-	T	T	C	T				
31	G	G	-	-	-	A	A	G	-	C	C	C	T	T	C	T				
38	A	G	-	-	C	A	C	G	-	C	C	-	T	T	C	T				
41	G	G	-	-	C	A	C	G	-	C	C	-	T	T	C	T				
43	G	G	-	-	C	A	C	G	-	C	C	-	T	T	C	T				
46	G	G	-	-	C	A	C	G	-	C	C	-	T	T	C	T				
48	G	G	-	-	C	A	C	G	-	C	C	-	T	T	C	T				
50	G	G	-	-	C	A	C	G	-	C	C	-	T	T	C	T				
53	G	G	-	-	C	A	C	G	-	C	C	-	T	T	C	T				
55	G	G	-	-	C	A	C	G	-	C	C	-	T	T	C	T				
61	G	G	-	-	C	A	C	G	-	C	C	-	T	T	C	T				
65	G	G	-	-	C	A	C	C	T	C	C	-	T	T	C	T				
72	G	G	-	-	C	A	C	G	-	C	C	-	T	T	C	T				
<i>F. sterilihyphosum</i>	G	A	-	-	C	G	C	G	-	T	G	-	T	-	T	T				
<i>Fusarium de Brasil</i>	G	A	-	-	C	G	C	G	-	T	G	C	C/T	-	T	T/G				

Continuación.....Cuadro 8A

Número de Aislamiento	Posición de los cambios en las bases																							
	411	421	423	440	441	450	492	493	496	600	610	611	612	614	616	644								
1	T	-	T	-	T	-	-	T	G	-	G	-	-	C	C	C								
2	T	-	T	-	T	-	-	T	G	-	G	-	-	C	C	C								
7	T	-	T	-	T	-	-	T	G	-	G	-	-	C	C	C								
12	T	-	T	-	T	-	-	T	G	T	G	-	-	C	C	C								
16	T	-	C	-	C	-	T	G	G	-	G	-	-	C	C	C								
19	T	-	T	-	T	-	-	T	G	-	G	-	-	C	C	C								
26	T	-	T	-	T	-	C	T	G	-	G	-	-	C	C	C								
31	T	-	T	-	T	-	-	T	G	-	T	C	C	T	C	C								
38	T	-	T	-	T	-	-	T	G	-	G	-	-	C	C	C								
41	T	-	T	-	T	-	-	T	G	-	G	-	-	C	C	C								
43	T	G	T	-	T	-	-	T	G	-	G	-	-	C	C	C								
46	T	-	T	-	T	-	-	T	G	-	G	-	-	C	C	C								
48	T	-	T	-	T	-	-	T	G	-	G	-	-	C	C	C								
50	T	-	T	-	T	-	-	T	G	-	G	-	-	C	C	C								
53	T	-	T	-	T	-	-	T	G	-	G	-	-	C	C	C								
55	T	-	T	-	T	-	-	T	G	-	G	-	-	C	C	C								
61	T	-	T	-	T	-	-	T	G	-	G	-	-	C	C	C								
65	T	-	T	A	T	T	-	T	G	-	G	-	-	C	C	T								
72	T	-	T	-	T	-	-	T	G	-	G	-	-	C	C	C								
<i>F. sterilihyphosum</i>	T	-	C	-	C	-	T	G	-	-	G	-	-	C	C	C								
<i>Fusarium de Brasil</i>	T/G	-	C	-	C	-	T	G	-	-	G	-	-	C	C/T	C								

**Cuadro 9A. Posición de los cambios en las bases en las secuencias del gen de histona de los aislamientos obtenidos de tejido malformado de mango.**

Número de Aislamiento	Posición de los cambios														
	35	39	66	69	113	155	260	261	277	294	310	370			
1	A	C	C	C	A	C	G	G	T	G	T	C			
2	A	C	C	C	A	C	G	G	T	G	T	T			
7	A	C	C	C	A	C	G	G	T	G	T	C			
12	A	C	C	C	A	C	G	G	T	G	T	T			
16	A	T	G	C	G	C	A	-	T	G	C	C			
19	A	T	G	C	G	C	A	G	T	G	C	C			
26	-	C	C	C	A	C	G	G	-	G	T	C			
31	A	C	C	C	A	C	G	G	T	G	T	C			
38	A	C	C	-	A	C	G	G	T	G	T	C			
41	A	C	C	C	A	C	G	G	T	G	T	C			
43	A	C	C	C	A	C	G	G	T	G	T	T			
46	A	C	C	C	A	C	G	G	T	G	T	C			
48	A	C	C	C	A	C	G	G	T	G	T	T			
50	A	C	C	C	A	C	G	G	T	G	T	C			
53	A	C	C	C	A	C	G	G	T	G	T	T			
55	A	C	C	C	A	C	G	G	T	G	T	C			
61	A	C	C	C	A	C	G	G	T	G	T	C			
65	A	C	C	C	A	T	G	G	T	G	C	C			
72	A	C	C	C	A	C	G	G	T	G	T	T			
<i>F. steriliniphosum</i>	A	T	G	C	G	C	G	G	T	-	C	C			

**Cuadro 10A. Posición de los cambios en las bases en las secuencias del gen de  $\beta$ -Tubulina de los aislamientos obtenidos de tejido malformado de mango.**

Número de Aislamiento	Posición de los cambios																																												
	9	11	18	28	57	97	143	184	196	292	342	352	353	364	365	366	372	383	384	389	391	400	401	454																					
1	A	C	A	T	G	-	G	G	T	T	G	C	A	C	-	A	A	A	G	-	C	-	C	-	C	T																			
2	T	C	A	T	G	-	G	G	T	T	G	C	A	C	-	A	A	A	G	-	C	-	C	-	C	T																			
7	T	C	A	T	G	A	G	G	T	T	G	C	A	C	-	A	A	A	G	-	C	-	C	-	C	T																			
12	T	C	A	T	G	-	G	G	T	T	A	T	C	C	-	A	C	-	G	-	C	-	C	-	C	T																			
26	T	C	A	T	G	-	G	G	T	T	G	C	A	C	-	A	A	A	G	-	C	-	C	-	C	T																			
31	T	C	A	T	G	-	G	G	T	T	G	C	A	C	-	A	A	A	G	-	C	-	C	-	C	T																			
38	T	C	-	T	G	-	G	G	T	T	G	C	A	C	-	A	A	A	G	-	C	-	C	-	C	-																			
41	T	C	A	T	G	-	G	G	T	T	G	C	A	C	-	A	A	A	G	-	C	-	C	-	C	T																			
43	T	A	A	A	G	-	G	G	T	T	G	C	C	G	G	A	A	A	G	T	C	-	C	-	C	T																			
46	T	C	A	T	G	-	G	G	T	T	G	C	A	C	-	A	A	A	G	-	C	-	C	-	C	T																			
48	T	C	A	T	G	-	G	G	T	T	G	C	A	C	-	A	A	A	G	-	C	-	C	-	C	T																			
50	T	C	A	T	G	-	G	G	T	T	G	C	A	C	-	A	A	A	G	-	C	-	C	-	C	T																			
53	T	C	A	T	G	A	G	G	T	T	G	C	A	C	-	A	A	A	G	-	C	-	C	-	C	T																			
61	T	C	A	T	G	-	G	G	T	T	G	C	A	C	-	A	A	A	G	-	C	-	C	-	C	T																			
72	T	C	A	T	G	-	G	G	T	T	G	C	A	C	-	A	A	A	G	-	C	-	C	-	C	T																			
<i>F. steriliphosum</i>	T	C	A	T	G	-	C	G	C	C	G	C	A	C	-	A	A	A	G	-	C	-	C	-	C	T																			
<i>Fusarium de Brasil</i>	T	C	A	T	A/G	-	C	A/G	C	C	G	C	A	C	-	A/T	A	A	A/G	-	C/T	-	C/T	-	C/T	T																			

**Continuación.....Cuadro 10A**

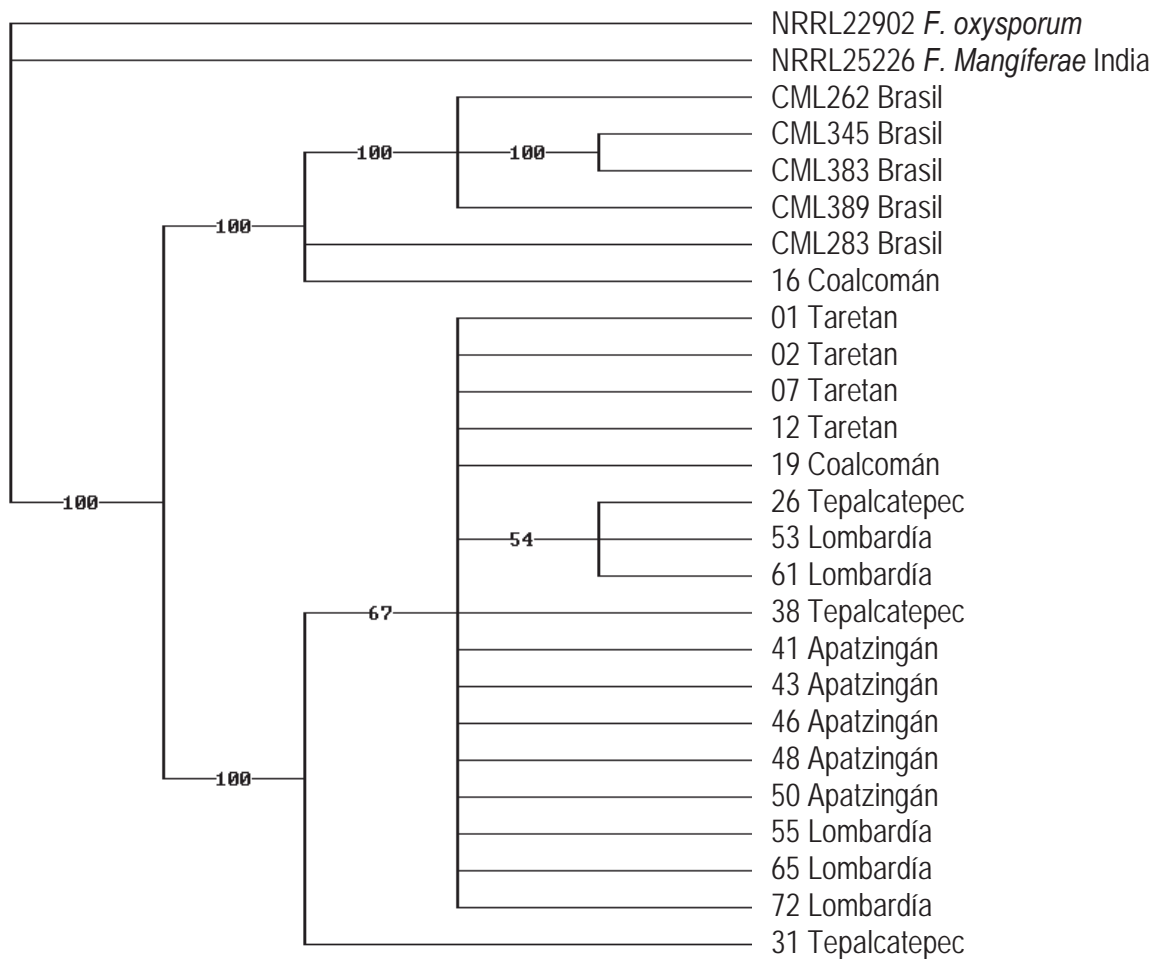
Número de		Posición de los cambios																																	
Aislamiento		455	456	457	463	472	491	493	494	496	505	508	514	516	517	520	521	526	527	529	532	533	534	538	540										
1	G	A	G	T	C	T	C	T	C	G	T	C	A	C	C	G	C	G	C	G	T	G	T	C	T	C									
2	G	A	G	T	C	T	C	T	C	G	T	C	A	C	C	G	C	C	G	T	G	T	C	T	C										
7	G	A	G	T	C	T	C	T	C	G	T	C	A	C	C	G	C	C	G	T	G	T	C	T	C										
12	G	A	G	T	A	T	C	T	C	G	T	C	A	C	C	G	C	C	G	T	G	T	C	T	C										
26	G	A	G	T	C	T	C	T	C	G	T	C	A	C	C	G	C	C	G	T	G	T	C	T	C										
31	G	A	G	T	C	T	C	T	C	G	T	C	-	C	C	G	C	C	G	T	G	T	C	T	C										
38	-	G	A	T	C	T	C	T	C	G	T	C	-	A	C	C	G	C	C	T	A	G	T	G	G										
41	G	A	G	T	C	T	C	T	C	G	T	C	A	C	C	G	C	C	G	T	G	T	C	T	C										
43	G	A	G	T	C	T	C	T	C	G	T	G	C	A	A	T	T	C	G	A	T	C	T	C	T	C									
46	G	A	G	T	C	T	C	T	C	G	T	C	A	C	C	G	C	C	G	T	G	T	C	T	C										
48	G	A	G	T	C	T	C	T	C	G	T	C	A	C	C	G	C	C	G	T	G	T	C	T	C										
50	G	A	G	T	C	T	C	T	C	G	T	C	A	C	C	G	C	C	G	T	G	T	C	T	C										
53	G	A	G	T	C	T	C	T	C	G	T	C	A	C	C	G	C	C	G	T	G	T	C	T	C										
61	G	A	G	T	C	T	C	T	C	G	T	C	A	C	C	G	C	C	G	T	G	T	C	T	C										
72	G	A	G	T	C	T	C	T	C	G	T	C	A	C	C	G	C	C	G	T	G	T	C	T	C										
<i>F. sterilihyphosum</i>	G	A	G	C	C	T	C	T	C	G	T	C	A	C	C	G	C	C	G	T	G	T	C	T	C										
<i>Fusarium de Brasil</i>	G	A	G	C/T	C	T	C	T	C	G	T	C	A	C	C	G	C	C	G	T	G	T	C	T	C										



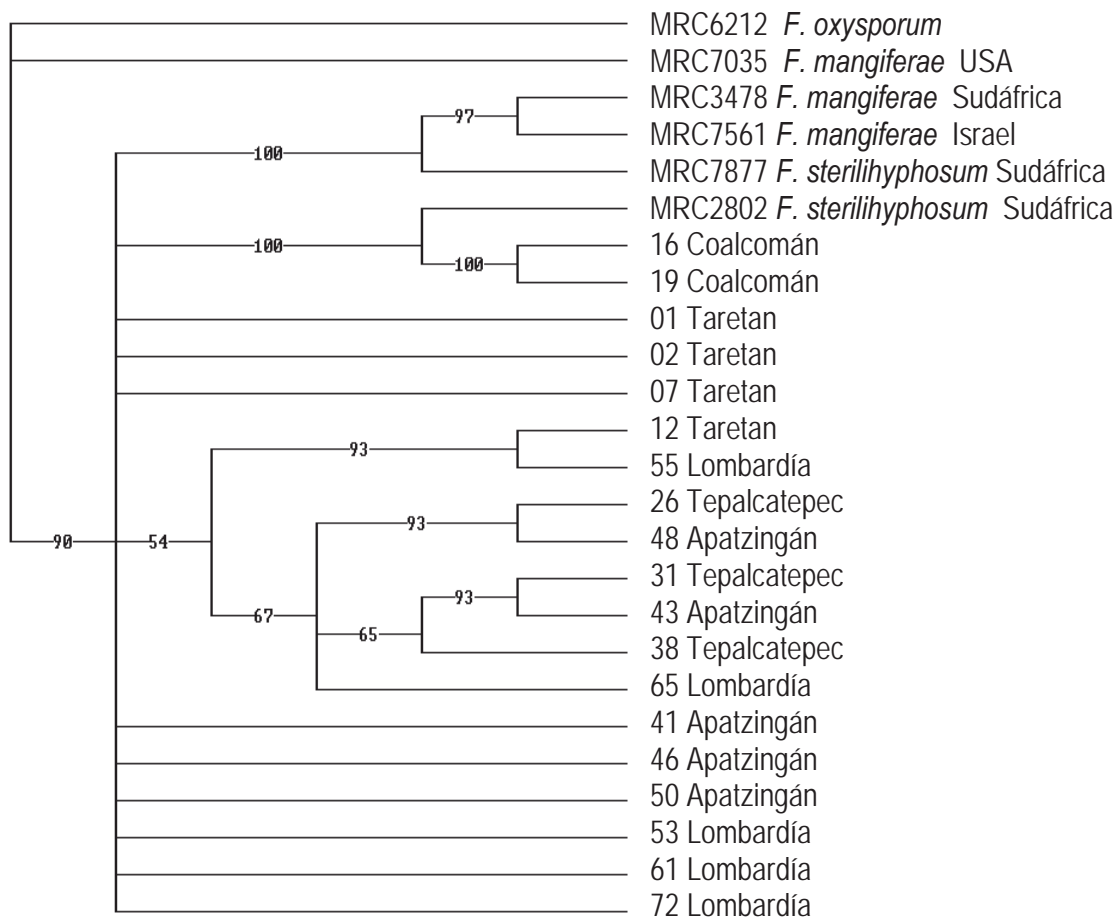
**Cuadro 11A. Resultados de los análisis de Máxima Parsimonia, Máxima Verosimilitud y Bayesiano practicados a las secuencias de los genes estudiados y sus combinaciones**

	Factor de elongación (FE)	Histona (H-3)	$\beta$ -Tubulina ( $\beta$ -T)	FE + H-3	FE + $\beta$ -T	H-3 + $\beta$ -T	FE + H-3 + $\beta$ T
Número de caracteres	658	546	539	1007	1152	664	1132
Caracteres Informativos para Parsimonia	32	70	37	38	45	46	34
Largo del árbol score	79	188	89	130	134	102	161
CI	0.9494	0.7553	0.9438	0.9538	0.9627	0.8922	0.9627
HI	0.0506	0.2447	0.0562	0.0462	0.0373	0.1078	0.0373
RI	0.9626	0.7416	0.9206	0.8966	0.95	0.8036	0.8696
RC	0.9139	0.5601	0.8689	0.8552	0.9146	0.7169	0.8372
Modelo evolutivo	TrN + G	HKY85 + G	K80 (K2P)	HKY85 + G	GTR	GTR + G	TIM
Valor Likelihood	1357.0343	1756.3514	1284.748	2093.0614	2416.1594	1441.3784	2746.8899

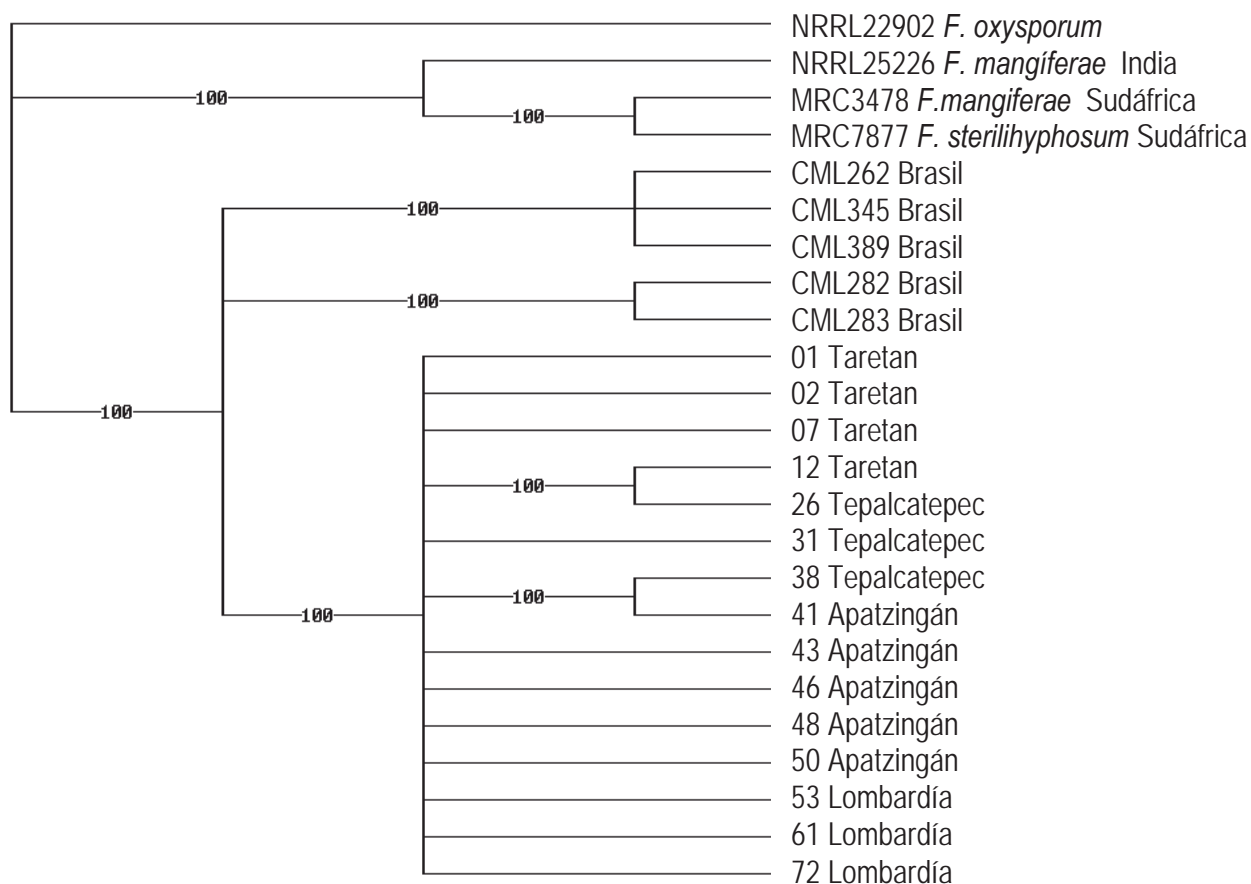
\* CI= Índice de consistencia; HI= Índice de homoplasia; RI= Índice de retención; RC= Índice de consistencia redimensionado



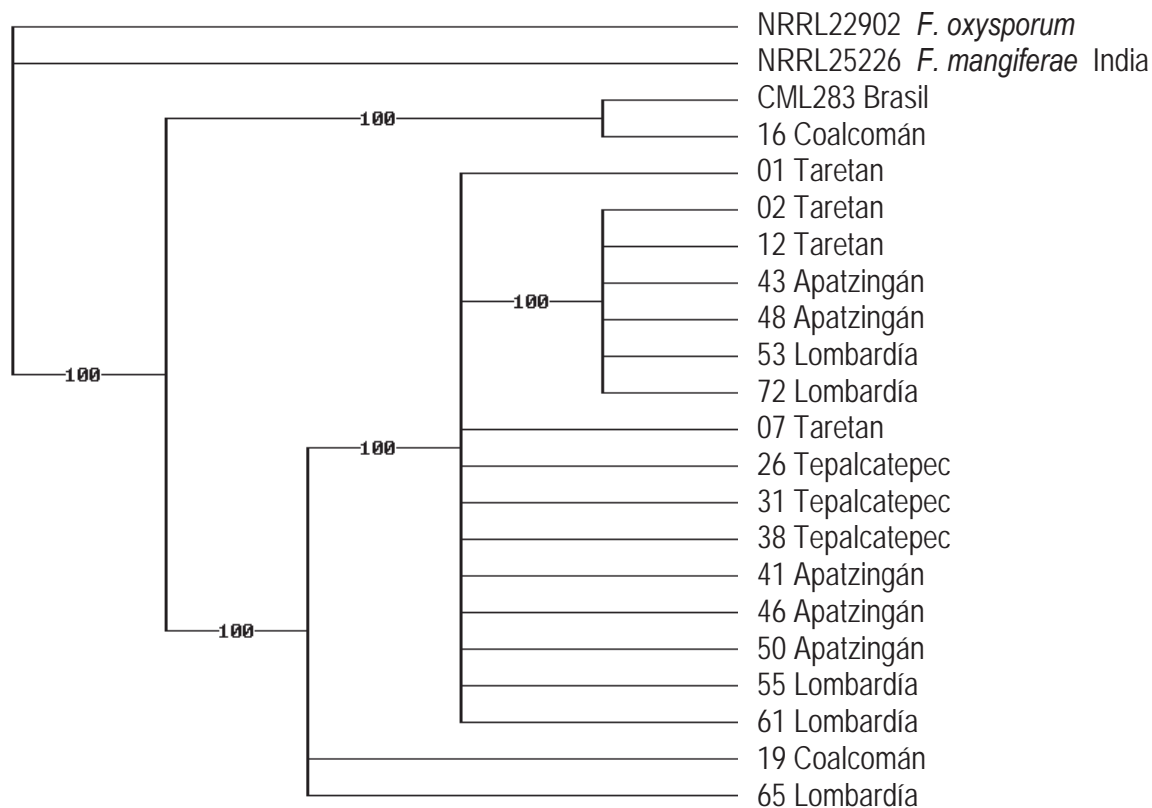
**Fig. 1A. Consenso estricto de 6258457 árboles más parsimoniosos derivados del análisis de las secuencias del gen del factor de elongación. NRRL, National Center for Agricultural Utilization Research, Peoria, Illinois USA. CML Colecao Micológica de Lavras, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil**



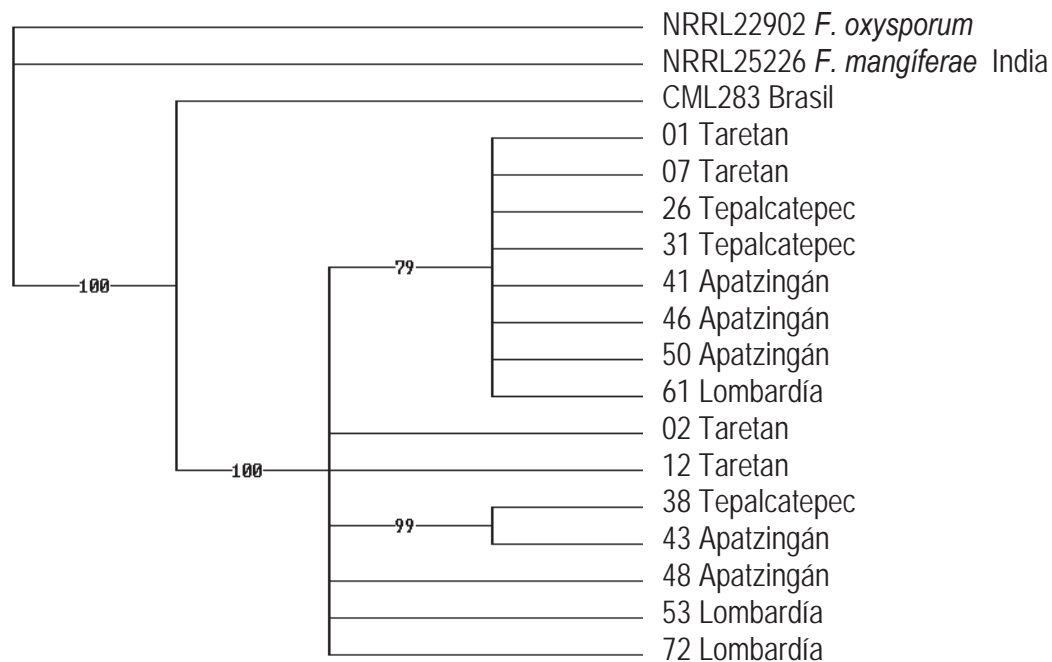
**Fig. 2A. Consenso estricto de 5816 árboles más parsimoniosos derivados del análisis de las secuencias del gen de Histona. MRC, Culture collection of the Medical Research Council, Tygerberg, South Africa.**



**Fig. 3A. Consenso estricto de 450 árboles más parsimoniosos derivados del análisis de las secuencias del gen beta-Tubulina. NRRL, National Center for Agricultural Utilization Research, Peoria, Illinois USA. MRC, Culture collection of the Medical Research Council, Tygerberg, South Africa. CML Colecao Micológica de Lavras, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil**



**Fig. 4A. Consenso estricto de 6995721 árboles más parsimoniosos derivados del análisis de la combinación de las secuencias de los genes del factor de elongación e Histona. NRRL, National Center for Agricultural Utilization Research, Peoria, Illinois USA. CML Colecao Micológica de Lavras, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil**



**Fig. 5A. Consenso estricto de 7793471 árboles más parsimoniosos derivados del análisis de la combinación de las secuencias de los genes del factor de elongación, histona y beta-Tubulina. NRRL, National Center for Agricultural Utilization Research, Peoria, Illinois USA. CML Colecao Micológica de Lavras, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil**