

Identificación molecular y biológica de las razas 0 y 5 de *Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr f. sp. *ciceris* (Padwick) Matuo & K. Sato del garbanzo en el noroeste de México*

Molecular and biological identification of physiological races 0 and 5 of *Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr f. sp. *ciceris* (Padwick) Matuo & K. Sato of chickpea in northwest Mexico

Sixto Velarde Félix¹, Pedro F. Ortega Murrieta², Gustavo A. Fierros Leyva², Isidoro Padilla Valenzuela³, Erasmo Gutierrez Pérez⁴, Franklin G. Rodríguez Cota⁵, José A. López Valenzuela⁶, Jorge A. Acosta Gallegos⁷ y José A. Garzón Tiznado^{6,8}

¹Campo Experimental Valle de Culiacán- INIFAP. Carretera Culiacán-Eldorado km 17.5, Culiacán, Sinaloa, México. C. P. 80430. ²Campo Experimental Costa de Hermosillo-INIFAP. Calle Pascual Encinas #21, Col. La Manga, Hermosillo, Sonora, México. ³Campo Experimental Norman E. Borlaug-INIFAP. Calle Dr. Norman E. Borlaug km 12. Cd. Obregón, Sonora, México. ⁴Sitio Experimental Santo Domingo-INIFAP. Carretera Transpeninsular Km. 208. Cd. Constitución, B. C. S., México. ⁵Campo Experimental Valle del Fuerte-INIFAP. Carretera. México-Nogales km 1609, Juan José Ríos, Sinaloa, México. ⁶Universidad Autónoma de Sinaloa, Facultad de Ciencias Químico Biológicas. Av. de Las Américas y Blvd. Universitarios s/n, Culiacán, Sinaloa, México. C. P. 80013. ⁷Campo Experimental Bajío- INIFAP. Carretera Celaya-San Miguel Allende Km. 6.5, Celaya Guanajuato, México. C. P. 38110. ⁸Autor para correspondencia: garzon24@uas.edu.mx.

Resumen

Fusarium oxysporum f. sp. *ciceris* (Foc) es un hongo fitopatógeno que causa la enfermedad conocida como fusariosis vascular en el cultivo del garbanzo. En México, el garbanzo para exportación sólo se cultiva en el Noroeste (Sinaloa, Sonora y Baja California Sur). Considerando que Foc limita la producción de este cultivo y que en México no existe información referente a la identificación de las razas fisiológicas de este hongo, el objetivo fue aislar e identificar mediante pruebas moleculares y biológicas las razas fisiológicas del hongo presentes en las zonas de cultivo de garbanzo de la región del noroeste de México. Durante el periodo 2010-2014 se colectaron plantas de garbanzo con síntomas de marchitez y amarillez en diferentes localidades de los estados de Sinaloa, Sonora y Baja California Sur. El hongo se aisló a partir de pequeñas porciones de la planta, los cuales fueron sembradas en medio de cultivo papa-dextrosa-agar suplementado con pentanitroclorobenceno (PCNB) y cloranfenicol. Se aislaron y purificaron cultivos monospóricos, a los cuales se les extrajo el ADN para la identificación de razas fisiológicas mediante PCR y

Abstract

Fusarium oxysporum f. sp. *ciceris* (Foc) is a phytopathogenic fungus that causes the disease known as Fusarium wilt in chickpea cultivation. In Mexico, chickpea export only grown in the Northwest (Sinaloa, Sonora and Baja California Sur). Considering that Foc limits the production of this crop and no information concerning the identification of physiological races of this fungus in Mexico, the goal was to isolate and identify by molecular and biological tests physiological races of the fungus present in the growing areas chickpea in the northwest region of Mexico. During the period 2010-2014 were collected chickpea plants with symptoms of wilting and yellowing at different locations in the States of Sinaloa, Sonora and Baja California Sur. The fungus was isolated from small portions of the plant, which were seeded in medium potato-dextrose agar culture medium supplemented with pentanitrochlorobenceno (PCNB) and chloramphenicol. We isolated and purified spore cultures, DNA was extracted for identification of physiological races by PCR and enzymatic sequencing. These strains were inoculated into chickpea in differential lines, confirming Mexico for the first time the identification of physiological races Foc 0 and 5.

* Recibido: julio de 2014
Aceptado: enero de 2015

secuenciación enzimática. Estas cepas se inocularon en líneas diferenciales de garbanzo, confirmando por primera vez en México la identificación de las razas fisiológicas 0 y 5 de Foc.

Palabras clave: garbanzo, líneas diferenciales, razas fisiológicas de Foc, secuenciación.

Introducción

Fusarium oxysporum f. sp. *ciceris* (Foc) es un habitante natural del suelo que causa una enfermedad descrita como fusariosis vascular y ha sido reportada en la mayoría de los países donde se cultiva garbanzo (Haware y Nene, 1982), en México, Foc es el fitopatógeno más importante dentro del complejo de hongos que provocan la enfermedad conocida como “rabia del garbanzo” en este cultivo (Velarde-Félix *et al.*, 2013). Investigaciones para evaluar fungicidas en semillas de garbanzo de diferente susceptibilidad, indican que algunos incrementan significativamente la emergencia de las plántulas y retrasan el comienzo de las enfermedades en cultivares moderadamente resistentes, pero no en cultivares altamente susceptibles como el caso de la línea P-2245 (Jiménez-Díaz y Trapero-Casas, 1985).

Lo anterior implica el empleo de otros elementos como la generación y el uso de variedades resistentes dentro de una estrategia de manejo integral de esta enfermedad, considerando que la eficiencia de los cultivares resistentes a ésta por sí sola, presenta limitaciones por la variabilidad patogénica de *Fusarium* (Jiménez-Gasco y Jiménez-Díaz, 2003; Sharma *et al.*, 2005; Sharma y Muehlbauer, 2007). El primer reporte relacionado con la especialización y razas fisiológicas de Foc fue descrito por Haware y Nene (1982) y a la fecha se han descrito ocho razas fisiológicas: 0, 1A, 1B/C, 2, 3, 4, 5, y 6. Las razas 0 y 1B/C inducen síntomas de amarillamiento (patotipo amarillez), mientras que las razas 1A, 2, 3, 4, 5 y 6, causan síntomas de marchitez (patotipo marchitez) (Jiménez-Díaz *et al.*, 1993; Jiménez-Gasco *et al.*, 2001).

Se tiene reportado que las ocho razas presentan distinta distribución geográfica. Las razas 2, 3 y 4 solo han sido descritas en la India (Haware y Nene, 1982; Sharma *et al.*, 2005); 0, 1B/C, 5 y 6 han sido principalmente mencionadas en la región del Mediterráneo y en California, E.U. (Phillips, 1988; Jiménez-Díaz *et al.*, 1993; Halila y Strange, 1996; Jiménez-Gasco y Jiménez-Díaz, 2003), mientras que la raza 1A ha sido consignada en la India (Haware y Nene, 1982),

Keywords: chickpea, differential lines, physiological races of Foc, sequencing.

Introduction

Fusarium oxysporum f. sp. *ciceris* (Foc) is a natural inhabitant of soil that causes a disease described as vascular "scab" and has been reported in most countries where chickpea (Haware and Nene, 1982) is grown in Mexico, Foc is the most important pathogen within the complex fungi that cause the disease known as "rage chickpea" in this culture (Velarde-Félix *et al.*, 2013). Fungicides research to evaluate different chickpea seeds susceptibility, indicating that some significantly increase seedling emergence and delay the onset of disease in moderately resistant cultivars, but not highly susceptible cultivars as the case of the line P-2245 (Jiménez-Díaz and Trapero-Casas, 1985).

This implies the use of other elements such as the generation and use of resistant varieties within a comprehensive management strategy for this disease, whereas the efficiency of resistant cultivars to it alone has limitations by pathogenic variability of *Fusarium* (Jiménez-Gasco and Jiménez-Díaz, 2003; Sharma *et al.*, 2005; Sharma and Muehlbauer, 2007). The first report related to the specialization and physiological races of Foc was described by Haware and Nene (1982) and to date have described eight physiological races: 0, 1A, 1B/C, 2, 3, 4, 5, and 6. The races 0 and 1B/C induce yellowing symptoms (yellowing pathotype), while races 1A, 2, 3, 4, 5 and 6, causing wilting symptoms (wilting pathotype) (Jiménez-Díaz *et al.*, 1993; Jiménez-Gasco *et al.*, 2001).

It is reported that the eight races have different geographical distribution. The races 2, 3 and 4 have been described only in India (Haware and Nene, 1982; Sharma *et al.*, 2005); 0, 1B/C, 5 and 6 have mainly been mentioned in the Mediterranean region and in California, USA (Phillips, 1988; Jiménez-Díaz *et al.*, 1993; Halila and Strange, 1996; Jiménez-Gasco and Jiménez-Díaz 2003), while the 1A race has been recorded in India (Haware and Nene, 1982), California and the Mediterranean region (Jiménez-Díaz *et al.*, 1993; Jiménez-Gasco *et al.*, 2001). Several techniques based on DNA molecular markers have been used to denote the genetic variability of the pathogen such as RAPD (Jiménez-Gasco *et al.*, 2001), AFLP (Sharma *et al.*, 2009), ITS and ISSR (Gayatri *et al.*, 2009) and its evolution in physiological races and pathotypes (Jiménez-Díaz *et al.*, 2002; Jiménez-Gasco *et al.*

California y la región del Mediterráneo (Jiménez-Díaz *et al.*, 1993; Jiménez-Gasco *et al.*, 2001). Existen diversas técnicas basadas en marcadores moleculares de ADN que se han usado para denotar la variabilidad genética de este patógeno como lo son los RAPD (Jiménez-Gasco *et al.*, 2001), AFLP (Sharma *et al.*, 2009; Gayatri *et al.*, 2009), ITS e ISSR (Gayatri *et al.*, 2009), así como su evolución en razas fisiológicas y patotipos (Jiménez-Díaz *et al.*, 2002; Jiménez-Gasco *et al.*, 2005); sin embargo, en México son escasos los estudios relacionados en este contexto, sin llegar a confirmar con precisión la identidad de las razas fisiológicas presentes (Luna-Páez *et al.*, 2004).

La identificación precisa de las razas de Foc es de gran importancia para la generación de variedades de garbanzo resistentes a la fusariosis vascular, ya que el conocimiento del patógeno y de sus razas fisiológicas, relacionadas con el comportamiento de las variedades cultivadas en una región determinada, es un aspecto importante para el manejo de la enfermedad (Jiménez-Gasco *et al.*, 2005; Sharma y Muehlbauer, 2007; Velarde-Félix *et al.*, 2013). El objetivo del presente trabajo fue aislar e identificar mediante pruebas moleculares y biológicas, las razas fisiológicas de Foc presentes en las zonas cultivadas de garbanzo de la región del noroeste de México.

Materiales y métodos

Material fúngico. Durante los periodos de siembra y desarrollo del garbanzo comprendidos entre los años 2010-2014, se colectaron 30 plantas con síntomas de amarillez y marchitez en cada uno de los 500 lotes agrícolas muestreados en siete municipios del estado de Sinaloa, tres de Sonora y uno de Baja California Sur, con un total de 15 000 plantas dentro de las áreas muestreadas (Figura 1, Cuadro 1). Cada planta muestreada se colectó durante un tiempo no mayor a los 40 días posteriores a la germinación de la semilla de garbanzo.

Aislamiento y purificación de cultivos monospóricos. De las plantas de garbanzo colectadas se cortaron cilindros de tallo de 3 mm, los cuales fueron desinfectados superficialmente con hipoclorito de sodio al 2% por 2 min y etanol al 70% por 2 min, seguido de tres lavados consecutivos con agua destilada estéril. Para el crecimiento y desarrollo del hongo, el tejido vegetal fue colocado en cajas de Petri con medio papa-dextrosa-agar (PDA-Difco) suplementado con PCNB (1.5 mL L^{-1}) y cloranfenicol (600 mg L^{-1}), incubándose a una

al., 2005); however, in Mexico there are few studies related in this context, without actually accurately confirm the identity of physiological races present (Luna-Páez *et al.*, 2004).

Accurate identification of the races of Foc is of great importance for the generation of chickpea varieties resistant to vascular "scab", since knowledge of the pathogen and its physiological races, related to the behaviour of the varieties grown in a region particular is an important management aspect of the disease (Jiménez-Gasco *et al.*, 2005; Sharma and Muehlbauer, 2007; Velarde-Félix *et al.*, 2013). The aim of this study was to isolate and identify by molecular and biological tests, physiological races of Foc present in cultivated areas chickpea in the region of northwest Mexico.

Materials and methods

Fungal material. During periods of planting and development of chickpea covered the years 2010-2014, 30 plants were collected with symptoms of yellowing and wilting in each of the 500 agricultural plots sampled in seven municipalities in Sinaloa three of Sonora and one of Baja California Sur, with a total of 15 000 plants within the sampled areas (Figure 1, Table 1). Each sampled plant was collected over a period not exceeding 40 days after seed germination of chickpea.

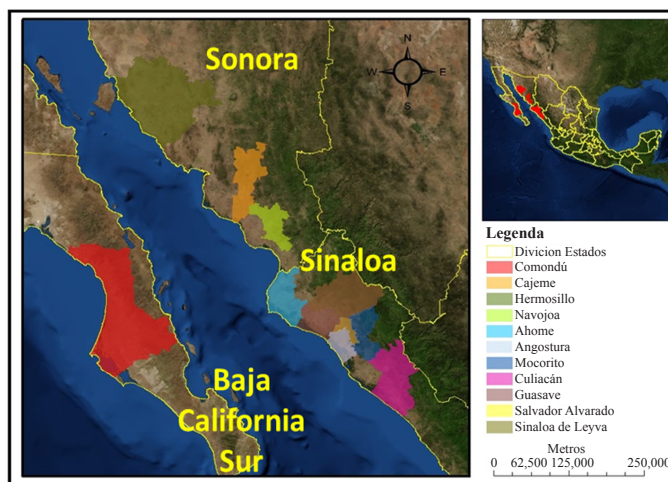


Figura 1. Mapa que muestran los municipios por estado del Noroeste de México, en donde se colectaron plantas de garbanzo con síntomas de fusariosis.

Figure 1. Map showing the municipalities by State in northwestern Mexico, where chickpea plants were collected with symptoms of "scab".

temperatura de 25 °C durante cinco días. La identificación de *Fusaria* se realizó con base a la morfología del micelio y microconidias en las fíalides, de acuerdo a lo propuesto por Leslie y Summerell (2006).

Isolation and purification of spore cultures. In plants collected chickpea cylinders stem 3 mm were cut, which were disinfested superficially with sodium hypochlorite at 2% for 2 min and 70% ethanol for 2 min, followed by

Cuadro 1. Coordenadas geográficas de los municipios de la región del noroeste de México donde fueron colectadas las plantas de garbanzo para la identificación de razas fisiológicas de *Fusarium oxysporum* f sp. ciceris.

Table 1. Geographical coordinates of the municipalities of the northwest region of Mexico where they were collected chickpea plants for identification of physiological races of *Fusarium oxysporum* f sp. ciceris.

Coordenadas geográficas	Municipio	Número de muestras	Estado
25° 48' 16" N 108° 54' 38" O	Ahome	1 600	Sinaloa
25° 19' 04" N 108° 05' 26" O	Guasave	1 750	Sinaloa
25° 11' 03" N 107° 44' 00" O	S. Alvarado	1 750	Sinaloa
25° 39' 54" N 107° 27' 56" O	Sin. de Leyva	1 900	Sinaloa
25° 00' 43" N 107° 47' 03" O	Angostura	1 900	Sinaloa
24° 35' 24" N 107° 23' 32" O	Culiacán	1 400	Sinaloa
25° 28' 52" N 107° 55' 13" O	Mocorito	1 150	Sinaloa
27° 06' 51" N 109° 26' 43" O	Navojua	550	Sonora
27° 29' 38" N 109° 56' 20" O	Cajeme	700	Sonora
28° 44' 48" N 110° 30' 45" O	Hermosillo	1 800	Sonora
25° 07' 35" N 111° 45' 30" O	Comondú	500	BCS
Total de muestras		15 000	-

Para obtener cultivos monospóricos de *Fusarium*, se cortó un pequeño fragmento del micelio crecido en medio PDA, el cual fue resuspendido en 1 mL de agua destilada estéril, se estimó la cantidad de esporas con un hematocitómetro y mediante diluciones seriadas se obtuvo el cultivo monospórico, de acuerdo a lo descrito por Hernández-Martínez y Rangel-Montoya (2011). Los aislamientos se observaron al microscopio compuesto (Olympus C x 31; utilizando el objetivo 4 x) ubicando esporas individuales germinadas; se marcó el sitio sobre el agar y un fragmento de este con la espóra germinada y seleccionada se transfirió a una nueva caja de Petri con medio PDA suplementado con PCNB y cloranfenicol, incubándose en las mismas condiciones anteriormente mencionadas. Por separado se transfirió un pequeño trozo de medio PDA con el hongo a tubos de ensaye que contenían arena tamizada estéril (8 x 10 hilos cm⁻³) y se guardó a temperatura ambiente para su preservación.

Extracción del ADN. Para la extracción del ADN se empleó el método previamente descrito (Velarde-Félix *et al.*, 2013), para ello, el micelio del hongo se obtuvo del medio de cultivo con el empleo de una asa bacteriológica, un fragmento de éste se maceró en mortero con pistilo de porcelana previamente

three washes consecutive with sterile distilled water. For growth and development of the fungus, the plant tissue was placed in petri dishes containing potato-dextrose-agar (PDA-Difco) supplemented with PCNB (1.5 mL L⁻¹) and chloramphenicol (600 mg L⁻¹) and incubated at a 25 °C for five days. The identification of *Fusaria* was made based on the morphology of mycelia and microconidia in phialides, according to the proposal of Leslie and Summerell (2006).

For spore cultures of *Fusarium*, we cut a small piece of mycelium grown on PDA medium, which was suspended in 1 mL of sterile distilled water, the amount of spores with a hematocytometer estimated and by serial dilutions of the culture was obtained monosporic, according to that described by Hernández-Martínez and Rangel-Montoya (2011). Isolates were observed under the microscope (Olympus C x 31; using Objective 4 x) placing individual spores germinated; the site on agar and a fragment thereof with the germinated spore selected and transferred to a new Petri dish with PDA medium supplemented with PCNB and chloramphenicol and incubated under the same above conditions are marked. Separately a small piece of PDA

esterilizados y enfriados a -70°C , al cual se agregó 1 mL de amortiguador de extracción que contenía: NaCl 30 mM, EDTA 30 mM y Tris Base 250 mM (pH 8.5). El producto de la maceración se colocó en tubos estériles de 1.5 mL. Enseguida se añadió a la muestra 100 μL de CTAB al 10% y 250 μL de NaCl 5M incubándose a 65°C durante 30 min y posteriormente se centrifugó. La solución acuosa fue lavada con un volumen de cloroformo y precipitada con isopropanol absoluto frío, finalmente la pastilla de ADN obtenida de los diferentes aislamientos se resuspendieron en 50 μL de agua libre de nucleasas (Promega) y se almacenó a 4°C .

Ensayos de PCR para Fo, Foc y razas fisiológicas. El ADN extraído de las muestras de *Fusaria*, se analizó por PCR, con el empleo de iniciadores específicos para Fo (FOF1-FOR1), Foc razas 0, 1A, 1B/C, 5 y 6, las cuales han sido reportadas en América (Jiménez-Gasco *et al.*, 2001), se utilizó un termociclador (Nyx Technik Amplitronyx Series 6 A6 (ATC401) Thermal Cycler). La mezcla de reacción final (15 μL) contenía 100 ng de ADN, una mezcla equimolar de dATP, dCTP, dGTP y dTTP, MgCl_2 , amortiguador de PCR, ADN *Taq* polimerasa (provisto por Promega® PCR Master Mix, Catalogo No. M7502), 40 pmoles de cada oligonucleótido (Sigma®). Las condiciones de amplificación para Fo fue de acuerdo a las descritas por Mishra *et al.* (2003) (Cuadro 2), mientras que para Foc y razas específicas fueron descritas por Jiménez-Gasco y Jiménez-Díaz (2003) (Tabla 2).

medium with the fungus to test tubes containing sterile sand sieved (8×10 threads cm^{-3}) was transferred and stored at room temperature for preservation.

DNA extraction. For DNA extraction we used the method previously described (Velarde-Félix *et al.*, 2013), the fungal mycelium was obtained from the culture medium with use of a bacteriological loop, a fragment thereof macerated in mortar with pestle porcelain previously sterilized and cooled to -70°C , to which was added 1 mL of extraction buffer containing: 30 mM NaCl, 30 mM EDTA and 250 mM Tris Base (pH 8.5). The product of macerating was placed in 1.5 mL sterile tubes. Then a 100 mL sample of 10% CTAB and 250 mL 5M NaCl and incubated at 65°C for 30 min and then was added was centrifuged. The aqueous solution was washed with one volume of chloroform and precipitated with cold absolute isopropanol finally the DNA pellet obtained from different isolates were suspended in 50 L of nuclease free water (Promega) and stored at 4°C .

PCR assays for Fo, Foc and physiological races. The DNA extracted from samples *Fusaria* was analysed by PCR with the use of specific primers Fo (foF1-FOR1), Foc races 0, 1A, 1B/C, 5 and 6, which have been reported in America (Jiménez-Gasco *et al.*, 2001), a thermocycler was used (Nyx Technik Amplitronyx Series 6 A6 (ATC401) Thermal Cycler). The final reaction mixture (15 μL) containing 100 ng DNA,

Cuadro 2. Condiciones de temperaturas de alineamiento y secuencias de iniciadores para el análisis por PCR de Fo, Foc y razas fisiológicas, en el cultivo de garbanzo en el Noroeste de México.

Table 2. Conditions of annealing temperatures and sequences of primers for PCR analysis of Fo, Foc and physiological races in chickpea in northwestern Mexico.

Secuencias de iniciadores 5' → 3'	Nom ^a	Kpb ^b	$^{\circ}\text{C}$ de A/ciclos ^c
D:ACATACCACTTGTTCCTCG R:CGCCAATCAATTTGAGGAACG	Fo	0.34	53/30
D:GGCGTTTCGCAGCCTTACAATGAG R:GACTCCTTTTTCCCGAGGTAGGTCAGAT	Foc	1.5	58/30
D:GGAGAGCAGGACAGCAAAGACTA R:GGAGAGCAGCTACCCTAGATACACC	R0	0.9	61/30
D:GAGAGCAGGGTCAGCGTAGATAG R:GCAGCAGAAGAGGAAGAAAATGTA	R1B/C	0.55	61/30
D:GGAAGCTTGGCATGACATAC R:AAGCTTGGGCACCTCTT	R5	0.9	61/30
D:GAGCAGTCAATGGCAATG G R:AGAGCAGGGTCAGCGTAGATA	R6	1	61/30
D:GGAGAGCAGTAGAGTTACAGCAGT ATT R:GGAGAGCAGCTACCCTAGATACACC	R1A y R6	1.4	61/30

a= nomenclatura; Fo= *Fusarium oxysporum*. Foc= F. o. f. sp. *ciceris*. Razas fisiológicas= R0, R1B/C, R5, R6 y R1A. b= tamaño del fragmento amplificado, kilo pares de bases; c= temperatura de alineamiento/ciclos de PCR; D= iniciador directo; R= iniciador reverso.

Las condiciones de amplificación para esta especie fueron: 1 ciclo a 95 °C, 5 min; 30 ciclos (95 °C, 1 min; 53 °C, 1 min; 72 °C, 1 min.) y un ciclo de extensión final a 72 °C, 10 min y 4 °C., mientras que para *Foc* y razas las cuales consistieron en: 1 ciclo a 95 °C, 5 min; 30 ciclos (95 °C, 1 min; 58 °C, 2 min; 72 °C, 2 min), un ciclo de extensión final a 72 °C, 10 min y 4 °C para *Foc* y para las razas, la diferencia fue el grado de alineamiento consistiendo en 61 °C. Los productos amplificados fueron analizados en geles de agarosa al 1%, teñidos con una solución de Gel Red (Biotium, Catálogo Núm. 41003).

Secuenciación enzimática

Los productos amplificados de las razas fisiológicas fueron escindidos de la agarosa y purificados a través de columnas de sílica (EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction Kit BS354, Bio Basic Inc.). Una vez obtenido el fragmento de PCR purificado, se procedió a enviar estas muestras para su secuenciación a el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO) del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV-IPN), Unidad Irapuato, Guanajuato, México, basada en el método ddNTPs (Sanger *et al.*, 1977), utilizando un secuenciador 3730 XL DNA (Applied Biosystems, Foster City, CA) y el kit Big Dye Terminator 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA). La búsqueda de similitud entre secuencias de ADN se realizó por medio del programa BLAST, con el cual se compararon las secuencias de nucleótidos en estudio, con las bases de datos del Centro Nacional para la Información de Biotecnología (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), identificándose los valores de homología.

Ensayos de razas fisiológicas de *Foc* mediante líneas diferenciales de garbanzo

Con el empleo de la secuenciación se detectaron la raza 0 (103 cepas monospóricas) y la raza 5 (212 cepas monospóricas). Por ello, se realizó un bioensayo de patogénesis en líneas diferenciales de garbanzo para confirmar biológicamente la identidad de estas razas en base a la respuesta de resistencia o susceptibilidad de cada línea diferencial, de acuerdo a la siguiente descripción. En inoculaciones artificiales de la raza 0, se ha descrito que las plantas susceptibles mueren hasta los 40 días después de la siembra en suelo, presentando el desarrollo progresivo de clorosis, amarillez y necrosis de folíolos, que progresan de forma acrópeta en la planta, dando lugar a la defoliación de esta (Trapero-Casas y Jiménez-Díaz, 1985; Navas-Cortés *et al.*, 2007). En la determinación

an equimolar mixture of dATP, dCTP, dGTP and dTTP, MgCl₂, PCR buffer, *Taq* DNA polymerase (supplied by Promega® PCR Master Mix, catalogue No. M7502), 40 pmoles of each oligonucleotide (Sigma®). Amplification conditions for *Fo* was according to those described by Mishra *et al.* (2003) (Table 2), while for *Foc* and specific breeds were described by Jiménez-Gasco and Jiménez-Díaz (2003) (Table 2).

The amplification conditions for this species were: 1 cycle at 95 °C, 5 min; 30 cycles (95 °C, 1 min; 53 °C, 1 min; 72 °C, 1 min) and a final extension cycle at 72 °C, 10 min and 4 °C, while for *Foc* races and which consisted of: 1 cycle at 95 °C, 5 min; 30 cycles (95 °C, 1 min; 58 °C, 2 min; 72 °C, 2 min), a cycle of final extension at 72 °C, 10 min and 4 °C for *Foc* and races, the difference was the degree of alignment consisting of 61 °C. The amplified products were analysed on agarose gels 1% solution Red Gel dyed (Biotium, catalogue no. 41003).

Enzymatic sequencing

Amplified products of physiological races were excised from the agarose and purified through silica columns (EZ-10 Spin Column BS354 DNA Gel Extraction Kit, Bio Basic Inc.). After obtaining the purified PCR fragment, we proceeded to send these samples for sequencing at the National Laboratory of Genomics for Biodiversity (LANGEBIO) Center for Research and Advanced Studies (CINVESTAV-IPN), Irapuato, Guanajuato, Mexico, ddNTPs based method (Sanger *et al.*, 1977), using a 3730 XL DNA Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA) and Big Dye Terminator 3.1 kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Similarity search of DNA sequences was performed using the BLAST program, whereby the nucleotide sequences in the study were compared with the databases of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), values identifying homology.

Testing of physiological races of *Foc* using differential chickpea lines

Using the sequencing race 0 (103 monosporic strains) and race 5 (212 monosporic strains) were detected. Therefore, a bioassay was performed in pathogenesis chickpea differential lines to confirm the identity of biologically these races based on the resistance or susceptibility response of each differential line, according to the following description. In artificial inoculations race 0, described that sensitive plants die until 40 days after sowing in soil, wherein the progressive development of chlorosis, yellowing and necrosis of leaflets,

de la raza 0, se usaron las líneas diferenciales JG-62 y P-2245 determinadas como resistente (R) y susceptible, respectivamente (S) (Rubio *et al.*, 2003).

En la raza 5, el síndrome de marchitez se describe como un desarrollo rápido de flacidez y clorosis en las hojas, en ausencia de amarillez, que se extiende poco después al resto de la planta. La flacidez es seguida por la desecación de hojas y tallos, los folíolos permanecen adheridos al raquis y posteriormente la planta muere antes de los 30 días después de la siembra en suelo (Trapero-Casas y Jiménez-Díaz, 1985; Navas-Cortés *et al.*, 2007; Sharma y Muehlbauer, 2007). Las líneas diferenciales para la raza 5 fueron: JG-62 (S), P-2245 (S), SANFORD (S), CRIL-1-53 (R), CRIL-1-94 (I= intermedia), CRIL-1-17 (R), CRIL-1-36 (R) y WR-315 (R) (Sharma y Muehlbauer, 2007).

Las semillas de las líneas diferenciales de garbanzo fueron obtenidas del banco de germoplasma de garbanzo del Campo Experimental Valle de Culiacán-INIFAP. Para la preparación del inóculo del hongo, este fue crecido en medio PDA suplementado con PCNB y cloranfenicol durante una semana, a 25 °C. De este medio, se cortaron ocho fragmentos de micelio y fueron depositados en un matraz con medio AMA (arena 450 g, harina de maíz 50 g, agua estéril 50 mL) incubados bajo las mismas condiciones durante 15 días. La desinfección de las semillas de garbanzo de cada una de las líneas diferenciales consistió en lavarlas en una solución de hipoclorito de sodio al 2.5% durante 3 min y posteriormente enjuagarlas en agua destilada estéril y para su germinación estas fueron depositadas en una incubadora a 25 °C durante 48 h.

Germinadas las semillas, estas fueron seleccionadas por uniformidad en tamaño, depositando cuatro plántulas por maceta. Para la preparación de la tierra-sustrato, se realizó una mezcla de tierra muerta (6 kg), turba (3 kg) y medio AMA (1 kg) (con inóculo del hongo) y 600 g de esta mezcla fueron depositados en macetas previamente esterilizadas. La cantidad de inóculo para ambas razas fue de 30 000 ufc/g de suelo. El experimento fue realizado con base al protocolo de Trapero-Casas y Jiménez-Díaz (1985) y Navas-Cortés *et al.* (2007) en un invernadero a 25 °C y un fotoperiodo de 12 h. Se realizaron tres repeticiones de macetas incluidos los testigos sin inóculo.

Las plantas se regaron con agua estéril cada 24 h durante todo el desarrollo del experimento y a partir de los 15 días después de la siembra, además las plantas fueron regadas una

progressing from acropetally in the plant, giving place to defoliation of this (Trapero-Casas and Jiménez-Díaz, 1985; Navas-Cortés *et al.*, 2007). In determining race 0, we used differential lines 62 and JG-2245-P determined as resistant (R) and susceptible respectively (S) (Rubio *et al.*, 2003).

On the race 5, wilt syndrome described as a rapid development of sagging and chlorosis of leaves, in the absence of yellowness, extending shortly after the rest of the plant. Sagging is followed by drying of leaves and stems, leaflets remain attached to the rachis and then the plant dies within 30 days after planting in soil (Trapero-Casas and Jiménez-Díaz, 1985; Navas-Cortés *et al.*, 2007; Sharma and Muehlbauer, 2007). The differential for race 5 lines were: JG-62 (S), P-2245 (S), SANFORD (S), CRIL-1-53 (R), CRIL-1-94 (I= intermediate), CRIL-1-17 (R), cril-1-36 (R) and WR-315 (R) (Sharma and Muehlbauer, 2007).

The seeds of differential chickpea lines were obtained from chickpea germplasm bank of Experimental Valle de Culiacán-INIFAP. In order to prepare the inoculum of the fungus, this was grown on PDA medium supplemented with PCNB and chloramphenicol for one week at 25 °C. This means, eight mycelial fragments were cut and were placed in a flask with AMA medium (450 g sand, 50 g of corn flour, 50 mL sterile water) incubated under the same conditions for 15 days. Disinfection chickpea seeds of each of the differential lines consisted of washing in a solution of sodium hypochlorite at 2.5% for 3 min and then rinsed in sterile distilled water for germination these were deposited in an incubator at 25 °C for 48 h.

Germinated seeds, selected for uniformity in size, depositing four seedlings per pot. For the preparation of land-substrate, a mixture of soil life (6 kg), peat (3 kg) and half AMA (1 kg) (inoculum of the fungus) and 600 g of this mixture was made were deposited in pots previously sterilized. The experiment was performed based on the protocol Trapero-Casas and Jiménez-Díaz (1985) and Navas-Cortés *et al.* (2007) in a greenhouse at 25 °C and a photoperiod of 12 h. Three repetitions of pots including controls without inoculum were performed.

The plants were irrigated with sterile water every 24 h throughout the course of the experiment and from 15 days after sowing, besides the plants were watered once a week with 100 mL of nutrient solution Hoagland (Hoagland and Amon, 1950). Reactions disease plants were evaluated observing the incidence and severity of symptoms on each plant in two day intervals using a range of scale commensurate with the percentage of foliage yellowing or wilting (0= 0%, 1= 1-33%,

vez por semana con 100 mL de solución nutritiva Hoagland (Hoagland y Amon, 1950). Las reacciones de la enfermedad de las plantas fueron evaluadas observándose la incidencia y severidad de los síntomas en cada planta en intervalos de dos días usando un rango de escala acorde al porcentaje del follaje con amarillez o marchitez (0=0%, 1=1-33%, 2=34-66%, 3=67-100% y 4=muerte de la planta) (Trapero-Casas y Jiménez-Díaz, 1985); Navas-Cortés *et al.* (2007). Finalmente, una vez terminado el experimento se aisló al hongo de la planta muerta y se identificó nuevamente mediante PCR.

Resultados y discusión

Colecta de muestras y aislamiento del patógeno. Se colectaron 15 000 muestras de plantas con síntomas de daño vascular previamente descritos (Jiménez-Díaz y Jiménez-Gasco, 2003; Sharma *et al.*, 2005; Sharma y Muehlbauer, 2007); sin embargo, sólo se obtuvieron 3 585 cultivos monospóricos de *Fusaria*, caracterizados mediante la forma y tamaño de las fialides de acuerdo a Leslie y Summerell (2006). Durante el proceso de aislamiento del hongo a partir de los tejidos vegetales con síntomas de daño vascular, 76.1% de las cajas de petri del cultivo *in vitro* se detectó la presencia de bacterias y otros hongos que posiblemente inhibieron el desarrollo de *Fusaria* lo que resultó en el aislamiento del hongo de interés en 23.9%. Esto coincide con reportes previos en donde señalan resultados similares al nuestro y mencionan que entre estos microorganismos es común encontrar antagonistas (Landa *et al.*, 2004).

Extracción del ADN

Se realizó el aislamiento de ADN de cada uno de los 3 585 cultivos monospóricos, mismos que se usaron para el análisis de Fo, Foc y razas mediante PCR y secuenciación.

Ensayos de PCR para la identificación de Fo, y razas fisiológicas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*.

A partir de las 3 585 muestras de ADN de los cultivos monospóricos de *Fusaria*, 3 224 correspondieron a Fo mediante PCR, correspondiendo al tamaño amplificado de 0.34 kbp propuesto por Mishra *et al.* (2003) (datos no mostrados) y de estas en 315 amplificados por PCR se obtuvo un tamaño aproximado de 1.5 kbp, predichos para la detección de Foc de acuerdo a la descripción de Jiménez-Gasco y Jiménez-Díaz (2003); en la Figura 2,

2=34-66%, 3=67-100% and 4=death of the plant) (Trapero-Casas and Jiménez-Díaz, 1985); Navas-Cortés *et al.* (2007). Finally, when the experiment ended fungus was isolated from dead plant and again identified by PCR.

Results and discussion

Collection of samples and pathogen isolation 15 000 plant samples were collected with symptoms of vascular damage previously described (Jiménez-Díaz and Jiménez-Gasco, 2003; Sharma *et al.*, 2005; Sharma and Muehlbauer, 2007); however, only 3 585 of spore cultures of *Fusaria* characterized by the shape and size of the phialides according to Leslie and Summerell (2006) were obtained. During fungal isolation from plant tissues with symptoms of vascular damage, 76.1% of the petri dishes of *in vitro* culture for bacteria and other fungi that may inhibit the development of *Fusaria* which resulted in the isolation of the fungus of interest in 23.9% was detected. This is consistent with previous reports where indicated similar to our results and mentioned that among these organisms is common to find antagonists (Landa *et al.*, 2004).

DNA extraction

DNA isolation from each monosporic of the 3 585, same cultures that were used for the analysis of Fo, Foc races and by PCR and sequencing was performed.

PCR assays for identification of Fo, and physiological races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*.

From 3 585 DNA samples of spore cultures of *Fusaria*, 3 224 corresponded to Fo by PCR, corresponding to the size of 0.34 kbp amplified proposed by Mishra *et al.* (2003) (data not shown) and of these 315 amplified by PCR an approximate size of 1.5 kbp, predicted for the detection of Foc according to the description of Jiménez-Gasco and Jiménez-Díaz (2003) was obtained; in Figure 2, the amplified fragments with the predicted size in some of the samples as examples describing Foc (lanes 4 to 20) are observed. In the lane corresponding to the negative control, was not observed amplified. On these samples amplified DNA, a specific analysis was made for physiological races 0, 1A, 1B/C, 5 and 6. In Figura 3, lanes 2 to 19 amplified fragment of 0.9 kbp described by Jiménez-Gasco and Jiménez-Díaz (2003) for the breed 0 in the rail 20, corresponding to the negative control without DNA observed corresponding to negative control not amplified. A total of 103 positive amplified for the breed 0 is obtained.

se observan los fragmentos amplificados con el tamaño predicho en algunas de las muestras analizadas a manera de ejemplo que describen a Foc (carriles 4 a 20). En el carril correspondiente al control negativo, no se observó amplificado. Sobre estas muestras de ADN amplificadas, se realizó un análisis específico para las razas fisiológicas “0”, “1A”, “1B/C”, “5” y “6”. En la Figura 3, en los carriles 2 al 19 se observan los fragmentos amplificados de 0.9 Kbp descritos por Jiménez-Gasco y Jiménez-Díaz (2003) para la raza “0”, en el carril 20, correspondiente al control negativo sin ADN, correspondiente al control negativo, no se observó amplificado. En total se obtuvieron 103 amplificados positivos para la raza “0”.

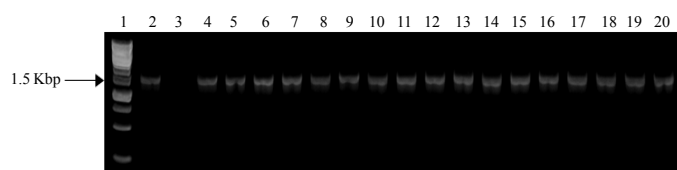


Figura 2. Análisis electroforético en agarosa al 1%. Amplificación mediante PCR con iniciadores Foc0-12f y Foc0-12r específicos para detectar a *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. Carriles: 1: Gene Ruler 1Kb DNA Ladder; 2: control positivo (ADN de *Foc*), 3: control negativo (sin ADN), 4-20: ADN de Fo obtenido de diferentes plantas de garbanzo con síntomas de “rabia” en diferentes localidades del noroeste de México.

Figure 2. Electrophoretic analysis on 1% agarose. PCR amplification with primers specific Foc0-12r Foc0-12f to detect *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. Lanes: 1: Gene Ruler 1Kb DNA Ladder; 2: positive control (DNA *Foc*); and 3: negative control (without DNA) 4-20: Fo DNA obtained from different chickpea plants with symptoms of “rage” in different localities in northwestern Mexico.

En la Figura 4, se describen los resultados correspondientes al análisis para la detección de la raza “5” en donde se distinguen los fragmentos amplificados con un tamaño predicho de 0.9 kbp en los carriles 2 al 19 en algunas de las muestras analizadas a manera de ejemplo. En el carril 20 correspondiente al control negativo, no se observa amplificación como se menciona en la observación anterior. En total se obtuvieron 212 amplificados para la raza “5”. Los tamaños moleculares para ambos amplificados coincidieron con los reportados (Jiménez-Gasco y Jiménez-Díaz, 2003), siendo estos de 1.5 para Foc y de 0.9 kbp, para las razas 0 y 5, con el empleo de diferentes pares de iniciadores como se describe en la Figura 2. Bajo esta metodología, las razas 1A, 1B/C y 6 no fueron identificadas.

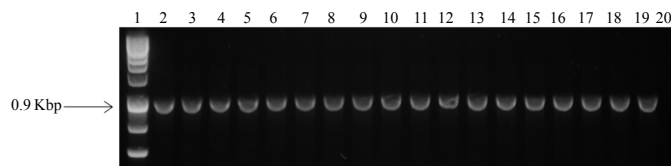


Figura 3. Análisis electroforético en agarosa al 1%. Amplificación mediante PCR con iniciadores FocR0-M15f y FocR0-M15r específicos para identificar a la raza 0 de Foc. Carriles: 1: HyperLadder III, 2-19: ADN de Foc obtenido de diferentes plantas de garbanzo con síntomas de “rabia” en diferentes localidades del noroeste de México. 20: control negativo (sin ADN).

Figure 3. Electrophoretic analysis on 1% agarose. PCR amplification with primers FocR0-M15f and FocR0-M15r to identify specific race 0 of Foc. Lanes: 1: Hyperladder III, 2-19 Foc DNA obtained from different chickpea plants with symptoms of “rage” in different parts of northwestern Mexico. 20: negative control (no DNA).

In Figure 4, the corresponding analysis results are described for detecting the race 5 where the amplified fragments are distinguished with a predicted size of 0.9 kbp in lanes 2 to 19 in some of the samples by way of example. In lane 20 corresponding to the negative control, no amplification is observed as mentioned in the previous observation. A total of 212 amplicons obtained for the race 5. The molecular sizes for both amplified coincided with those reported (Jiménez-Gasco and Jiménez-Díaz, 2003), these 1.5 for Foc and 0.9 kbp, for races 0 and 5, with the use of different primer pairs as described in Figure 2. Under this methodology, 1A, 1B/C and 6 breeds were not identified.

Enzymatic sequencing

The sequence identity of the predicted 0.9 kbp fragments in our study had a 100% identity to the race 0 and race 99% compared to 5 accessions registered as GenBank AF491870 and AF491869, respectively. Both were admitted to GenBank as KJ000583-race-race KJ000584 0 and 5. As to the comparison of the nucleotide sequences between these two races, it is unnecessary because the primers used for both races are different.

Identification of physiological races of Foc using differential chickpea lines

For the analysis of physiological races of Foc of our study, using differential lines, strains registered in GenBank as race 0 (KJ000583) and race 5 (KJ000584) were used. In the bioassay for pathogenicity race 0 the characteristic symptom

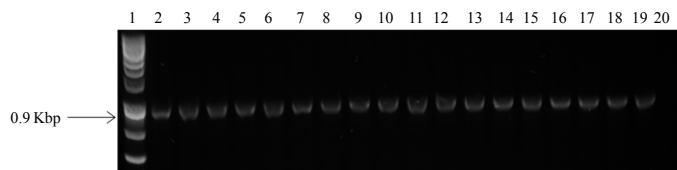


Figura 4. Análisis electroforético en agarosa al 1%. Amplificación mediante PCR con iniciadores FocR5-L10f y FocR5-L10r específicos para identificar a la raza 5 de Foc. Carriles: 1: HyperLadder III, 2-19: ADN de Foc obtenido de diferentes plantas de garbanzo con síntomas de “rabia” en diferentes localidades del noroeste de México. 20: control negativo (sin ADN).

Figure 4. Electrophoretic analysis on 1% agarose. PCR amplification with primers L10F FocR5-and-L10r FocR5 to identify specific race 5 of Foc. Lanes: 1: Hyperladder III, 2-19 Foc DNA obtained from different chickpea plants with symptoms of “rage” in different parts of northwestern Mexico. 20: negative control (no DNA).

Secuenciación enzimática

La identidad de las secuencias de los fragmentos predichos de 0.9 kbp en nuestro estudio, tuvo una identidad 100% para la raza 0 y 99% para la raza 5 comparadas con las accesiones registradas en el GeneBank como AF491870 y AF491869, respectivamente. Ambas fueron ingresadas al GeneBank como KJ000583-raza 0 y KJ000584-raza 5. En cuanto a la comparación de las secuencias nucleotídicas entre estas dos razas, no procede debido a que los iniciadores usados para ambas razas son diferentes.

Identificación de razas fisiológicas de Foc mediante líneas diferenciales de garbanzo

Para el análisis de las razas fisiológicas de Foc de nuestro estudio, mediante líneas diferenciales, se emplearon las cepas registradas en el GeneBank como raza 0 (KJ000583) y raza 5 (KJ000584). En el bioensayo de patogenicidad para la raza 0 se observó el síntoma característico de amarillamiento del follaje, en las 12 plantas evaluadas del genotipo P-2245 (S), mientras que las 12 plantas de la línea JG-62 (R) no mostró ningún síntoma. Después de 60 días de la inoculación, las 12 plantas de P-2245 murieron (Cuadro 3), lo cual coincide con lo reportado por Trapero-Casas y Jiménez-Díaz, (1985); Navas-Cortés *et al.* (2007), para identificar la raza 0 (Figura 5).

of yellowing foliage was observed in 12 test plants genotype P-2245 (S), while 12 plants of the line JG-62 (R) showed no symptom. After 60 days of inoculation, the 12 P-2245 plants died (Table 3), which coincides with that reported by Trapero-Casas and Jiménez-Díaz (1985); Navas-Cortés *et al.* (2007), for identify race 0 (Figure 5).

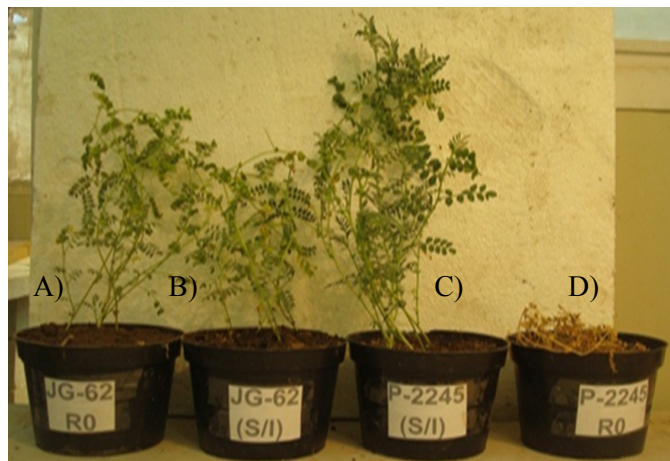


Figura 5. Bioensayos mediante inoculación artificial sobre líneas diferenciales específicas para identificar la Raza 0 de Foc. A) JG-62: sin sintomatología de amarillez, B) JG-62: control negativo sin sintomatología de amarillez, C) P-2245: control negativo sin sintomatología de amarillez; y D) P-2245: con inoculo, desarrollando amarillez y muerte de las plantas.

Figure 5. Bioassays by artificial inoculation on to identify specific races 0 of Foc, differential lines A) JG-62: without symptoms of yellowing; B) JG-62: negative control without symptoms of yellowing; and C) P-2245: negative control without symptoms of yellowing; and D) P-2245: with inoculum, developing yellowing and death of plants.

With respect to race 5, wilt damage appeared in the foliage of plants differential JG-62, P-2245, SANFORD and CRIL-1-94 from 19 days of start of the experiment, while lines CRIL-1-53, CRIL-1-17 and 1-36 CRIL-WR-315, showed no damage. Later, at 38 days, 12 plants JG-62 and P-2245 died, while not in the differential described as SANFORD, where survived 3 plants CRIL-94 kept alive 6 plants. The CRIL-1-53, CRIL-1-17, 1-36 and CRIL-WR-315 differential showed no damage during the 60 days of testing (Table 4). Differential plants used as controls without inoculum to confirm the two races, showed no damage, coinciding with those reported by Trapero-Casas and Jiménez-Díaz (1985) and Navas-Cortés *et al.* (2007) (Figure 6).

Cuadro 3. Resultados de la evaluación a la resistencia y susceptibilidad de las diferenciales de garbanzo seleccionadas a la raza 0.**Table 3. Results of the evaluation of the resistance and susceptibility of differential chickpea selected to race 0.**

Línea diferencial	Plantas evaluadas	Plantas vivas	Plantas muertas	Incidencia de la severidad (%)
JG-62	12	12	0	R (0)
P-2245	12	0	12	S (100)

Con respecto a la raza 5, los daños de la marchitez aparecieron en el follaje de las plantas diferenciales JG-62, P-2245, SANFORD y CRIL-1-94 a partir de los 19 días de inicio del experimento, mientras que las líneas CRIL-1-53, CRIL-1-17, CRIL-1-36 y WR-315, no presentaron daño. Posteriormente, a los 38 días, las 12 plantas de JG-62 y P-2245 murieron, mientras que no así en la diferencial descrita como SANFORD, en donde sobrevivieron 3 plantas y CRIL-94 que mantuvo vivas 6 plantas. Las diferenciales CRIL-1-53, CRIL-1-17, CRIL-1-36 y WR-315 no presentaron daño durante el periodo de 60 días en que se desarrolló el ensayo (Cuadro 4). Las plantas de las diferenciales usadas como testigos sin inoculo para confirmar las dos razas, no mostraron daño, coincidiendo con lo reportado por Trapero-Casas y Jiménez-Díaz. (1985) y Navas-Cortés *et al.*, 2007 (Figura 6).

Fusarium wilt of chickpea growing areas in northwestern Mexico so far and the work in this study confirms is mainly caused by the races 0 and 5, same that were analysed by PCR, sequencing and differential tests. None of the sampled batch was identified races 1A, 1B/C, 6 or other races, this could be because other races have not adapted to climatic conditions and time of planting, together we could be implied that lines and varieties generated in the breeding program of chickpea in Mexico are resistant to them. The use of molecular and biological to establish the identity of physiological races of Foc, methodologies considered essential, since both are complementary under the effective use of differential chickpea lines that have been historically used (Haware and Nene; 1982).

It is influenced by genotype, the condition of the bioassay and observation of the researcher, while the molecular characterization (PCR and enzymatic sequencing) is in an

Cuadro 4. Resultados de la evaluación a la resistencia y susceptibilidad de las diferenciales de garbanzo que identifican a la raza 5.**Table 4. Results of the evaluation of the resistance and susceptibility of differential chickpea which identify five race.**

Línea diferencial	Plantas evaluadas	Plantas vivas	Plantas muertas	Incidencia de la severidad (%)
JG-62	12	0	12	S (100)
P-2245	12	0	12	S (100)
Sanford	12	3	9	S (25)
CRIL-1-53	12	12	0	R (100)
CRIL-1-94	12	6	6	I (50)
CRIL-1-17	12	12	0	R (100)
CRIL-1-36	12	12	0	R (100)
WR-315 R	12	12	0	R (100)

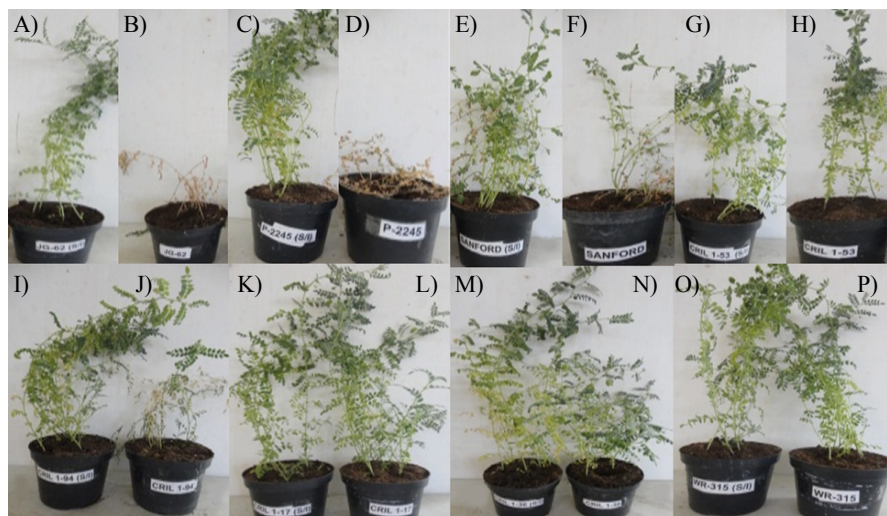


Figura 6. Bioensayos sobre líneas diferenciales para identificar la Raza 5 de Foc mediante inoculación artificial. A) JG-62: control negativo sin sintomatología; B) JG-62: con inoculo, presencia de marchitez y muerte de plantas; C) P-2245: control negativo sin sintomatología; D) P-2245: con inoculo y presencia de marchitez y muerte de plantas; E) Sanford: control negativo sin sintomatología; F) SANFORD: con inoculo, plantas con sintomatología de marchitez y muerte; G) CRIL-1-53: control negativo sin sintomatología; H) CRIL-1-53: con inoculo, sin sintomatología de marchitez; I) CRIL-1-94: control negativo sin sintomatología; J) CRIL-1-94: con inoculo, desarrollando algunas plantas sintomatología de marchitez y muerte; K) CRIL-1-17: control negativo sin sintomatología; L) CRIL-1-17: con inoculo, desarrollando algunas plantas síntomas de marchitez y muerte; M) CRIL-1-36: control negativo sin sintomatología; N) CRIL-1-36: con inoculo, sin sintomatología; O) WR-315: control negativo sin sintomatología; y P) WR-315: con inoculo, sin sintomatología.

Figure 6. Bioassay on differential to identify race 5 of Foc by artificial inoculation lines. A) JG-62: negative control without symptoms; B) JG-62: with inoculum presence of wilting and death of plants; C) P-2245: negative control without symptoms; D) P-2245: with inoculum and the presence of wilting and death of plants; E) Sanford: negative control without symptoms; F) SANFORD: with inoculum plants with symptoms of wilting and death; G) CRIL-1-53: negative control without symptoms; H) CRIL-1-53: with inoculum without wilting symptoms; I) CRIL-1-94: negative control without symptoms; J) CRIL-1-94: with inoculum, some plants developed symptoms of wilting and death; K) CRIL-1-17: negative control without symptoms; L) CRIL-1-17 with inoculum, some plants developed symptoms of wilting and death; M) CRIL-1-36: negative control without symptoms; N) CRIL-1-36: with inoculum without symptoms; and O) WR-315: negative control without symptoms; and P) WR-315: with inoculum without symptoms.

La fusariosis vascular del garbanzo en las zonas de cultivo en el Noroeste de México, hasta el momento y por los trabajos en este estudio se confirma es ocasionada principalmente por las razas 0 y 5, mismas que fueron analizadas mediante PCR, secuenciación y pruebas diferenciales. En ninguno de los lotes muestreados se logró identificar las razas 1A, 1B/C, 6 u otras razas, esto podría deberse a que otras razas no se han adaptado a las condiciones climáticas y época de siembra, aunado que podría estar implicado que las líneas y variedades generadas en el programa de mejoramiento genético del garbanzo en México sean resistente a ellas. Se considera fundamental el empleo de las metodologías moleculares y biológicas para establecer la identidad de razas fisiológicas de Foc, ya que ambas son complementarias en virtud de que la efectividad del uso de las líneas diferenciales de garbanzo que se han empleado históricamente (Haware y Nene; 1982).

initial phase, which is demonstrated by the small number of accession with that account in the GenBank, hence the use of both methods in the speciation process of this fungus is proposed. Finally the identity of these two physiological races of Foc found in the Northwest of Mexico represents a key for the program chickpea breeding base, as it has proven that the best selection of lines is through the answer as to resistance and susceptibility to the disease under controlled conditions (Jiménez-Díaz *et al.*, 1993).

Conclusions

3 585 isolated monoosporicos were obtained of the 15 000 samples analysed of chickpea plants for symptomatic *Fusarium* by PCR, out of which 315 were identified as Foc.

Está influenciado por el genotipo, la condición del bioensayo y la observación del investigador, mientras que la caracterización molecular (PCR y secuenciación enzimática) se encuentra en una fase inicial, lo cual se demuestra por el reducido número de accesión con que se cuenta en el GenBank, de ahí que se proponga el uso de ambos métodos en el proceso de especiación de este hongo. Finalmente la identidad de estas dos razas fisiológicas de Foc encontradas en la región del Noroeste de México representa una base fundamental para el programa de mejoramiento genético del garbanzo, ya que se tiene comprobado que la mejor selección de líneas, es mediante la respuesta en cuanto a resistencia y susceptibilidad de la enfermedad bajo condiciones controladas (Jiménez-Díaz *et al.*, 1993).

Conclusiones

Se obtuvieron 3 585 aislados monoosporicos de las 15 mil muestras de plantas de garbanzo sintomáticas analizadas para *Fusarium* por PCR, de los cuales 315 fueron identificadas como Foc.

Al analizar por PCR 315 aislamientos identificados como Foc, 103 amplificaron para la raza 0 y 212 para la raza 5.

Al comparar las secuencias de ADN de un amplificado correspondiente a la raza 0, con la accesión del GeneBank AF491870, se encontró una identidad de 100% y de otro amplificado correspondiente con la raza 5, con la accesión AF491869, se encontró una identidad de 99%.

Mediante los bioensayos de inoculación a plantas diferenciales, las respuestas de estas fueron específicas para la raza 0 y raza 5.

Por análisis de PCR específico, Secuenciación del ADN y bioensayos de genotipos diferenciales Se confirmó que las razas fisiológicas de Foc que infectan al garbanzo en las zonas de cultivo del Noroeste de México son la raza 0 y la raza 5.

La raza 5 se detectó con mayor frecuencia que la raza 0.

No se detectaron las razas 1A, 1B/C y 6.

When analysed by PCR 315 isolates identified as Foc, 103 amplified to race 0 and 212 for the race in 5.

By comparing the DNA sequences corresponding to race 0, with GenBank accession AF491870, amplified 100% identity and other relevant amplified with race 5, with the accession AF491869 found an identity of 99%.

By inoculation bioassays differential plants, the responses of these were specific to race 0 and race in 5.

For analysis of specific PCR, DNA sequencing and differential genotypes bioassays confirmed that the physiological races of Foc infecting chickpea growing areas of northwest Mexico are race 0 and race 5.

Race 5 was detected more frequently than race 0.

1A, 1B/C and 6 races were not detected.

End of the English version



Literatura citada

- Gayatri, G.; Maneesha, B.; Ashok, G. and Vidya G. 2009. Identification of Indian pathogenic races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* with gene specific, ITS and random markers. *Mycologia*. 101(4):484-495.
- Halila, H. M. and Strange, R. N. 1996. Identification of the causal agent of wilt of chickpea in Tunisia as *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* race 0. *Phytopathol Medit* 35:67-74.
- Haware, M. P and Nene, Y. L. 1982. Races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. *Plant Dis*. 66:809-810.
- Hernández-Martínez, R. y Rangel-Montoya, E. A. 2011. Búsqueda de cepas de *Trichoderma* antagonistas a hongos causantes de marchitez vascular en tomate. *Revista Electrónica de Divulgación de la Investigación*. 1-9.
- Hoagland, D. R. and Amon D. I. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular* 347:1-32.
- Jiménez-Díaz, R. M.; Alcalá-Jiménez, A.; Hervás, R. and Trapero-Casas, J. L. 1993. Pathogenic variability and host resistance in the *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*/*Cicer arietinum* pathosystem. In: Arseniuk, E. and Goral, T. (Eds.). *Fusarium* mycotoxins, taxonomy, pathogenicity and host resistance. *Proceeding of the 3rd European Seminar. Plant Breeding and Acclimatization Institute, Radzikov, Poland*. 325:87-94.
- Jiménez-Gasco, M. M. and Jiménez-Díaz, R. M. 2003. Development of a specific PCR-based assay for the identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and its pathogenic races 0, 1A, 5, and 6. *Phytopathology* 93: 200-209.

- Jiménez-Díaz, R. M.; Jiménez-Gasco, M. M. and Milgroom, M. G. 2002. Gene genealogies support *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* as a monophyletic group. *Plant Pathol.* 51:72-77.
- Jiménez-Gasco, M. M.; Navas-Cortés, J. A. y Jiménez-Díaz, R. M. 2005. Evolución de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, el agente de la fusariosis vascular del garbanzo, en razas patogénicas y patotipos. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas.* 31:59-69.
- Jiménez-Gasco, M. del Mar.; Pérez-Artes, E. and Jiménez-Díaz, R. M. 2001. Identification of pathogenic races 0, 1B/C and 6 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* with random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Eur. J. Plant Pathol.* 107:237-248.
- Landa, B. B.; Navas, C. J. A. and Jiménez, D. R. M. 2004. Integrated management of *Fusarium* wilt of chickpea with sowing date, host resistance, and biological control. *Phytopathology* 94:946-960.
- Leslie, J. F. and Summerell, B. A. 2006. *The Fusarium laboratory manual*. Blackwell Publishing Ltd.
- Luna-Páez, A.; Silva-Rojas, H. V.; Marbán-Mendoza, N. y Valadez-Moctezuma, E. 2004. Variabilidad genética de *Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr. f. sp. *ciceris* (Padwick) Matuo mediante PCR-RAPD's PCR en el Bajío, México. *Rev. Mex. Fitopatol.* 44-51.
- Mishra, P. K.; Fox, R. T. V. and Culham A. 2003. Development of a PCR based assay for rapid and reliable identification of pathogenic Fusaria. *FEMS Microbiology Letters* 218:329-32.
- Navas-Cortés, J. A.; Landa, B. B.; Méndez-Rodríguez, M. A. y Jiménez-Díaz, R. M. 2007. Quantitative modeling of the effects of temperature and inoculum density of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* races 0 and 5 on development of *Fusarium* wilt in chickpea cultivars. *Phytopathology.* 97:564-573.
- Phillips, C. J. 1988. A distinct race of chickpea wilt in California. *International Chickpea Newsletter.* 18:19-20.
- Rubio, J.; Hajj-Moussa, E.; Kharrat, M.; Moreno, M. T.; Millan, T. and Gill, J. 2003. Two genes and linked RAPD markers involved in resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* race 0 in chickpea. *Plant Breed* 122:188-191.
- Sanger, F.; Nicklen, S. and Chase, A. R. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 74(12):5463-5468.
- Sharma, M.; Kumar, R. V.; Narayan, R. J.; Kannan, S.; Hoisington, D. and Pande, S. 2009. Genetic diversity in Indian isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, chickpea wilt pathogen. *Afr. J. Biotechnol.* 8(6):1016-1023.
- Sharma, K. D. and Muehlbauer, F. J. 2007. *Fusarium* wilt of chickpea: physiological specialization, genetics of resistance and resistance gene tagging. *Euphytica.* 157:1-14.
- Sharma, K. D.; Weidong, C. and Muehlbauer, F. 2005. Genetics of chickpea resistance to five races of *Fusarium* wilt and a concise set of race differentials for *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Plant Dis.* 89:385-390.
- Trapero-Casas, A. and Jiménez-Díaz, R. M. 1985. Fungal wilt and root rot diseases of chickpea in southern Spain. *Phytopathology.* 75:1146-115.
- Velarde-Félix, S.; Zamora-Galván, F.; Valdez-Rubio, N.; Cárdenas-Molina, L.; López-Molina, R.; Ángeles-Valdéz, J. A.; Fierros-Leyva, G. A.; Ortega-Murrieta, P. F.; Padilla-Valenzuela, I. y Gutierrez-Pérez, E. 2013. Distribución y presencia de la fusariosis del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en el Noroeste de México y búsqueda de resistencia en condiciones controladas. *In: Memoria Simposio Nacional de Garbanzo 2013.* INIFAP. 54-64 pp.