

UCUENCA

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Agronomía

Evaluación de la resistencia de seis variedades de trigo (*Triticum aestivum* L.) a tres cepas de *Fusarium* spp.

Trabajo de titulación previo a la
obtención del título de
Ingeniero Agrónomo

Autor:

Byron Mauricio Padilla Romero

CI: 0350116463

Correo electrónico: pbyronmauricio_95@hotmail.com

Director:

Ing. Patricio Salvador Castro Quezada. PhD

CI: 1103411151

Cuenca - Ecuador

07-diciembre-2022

Resumen:

En Ecuador uno de los factores que limitan la producción de trigo son las enfermedades, siendo uno de las más importantes la enfermedad denominada “fusariosis” de la espiga de trigo. Esta enfermedad es producida por varias especies del hongo *Fusarium* spp. Esta enfermedad tiene gran importancia económica debido a que puede reducir la producción en más de un 50%. El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en invernadero, con el fin evaluar la resistencia de seis variedades de trigo descritas anteriormente como resistentes a la infección de tres cepas de *Fusarium* spp. La caracterización morfológica de las cepas se realizó en base a claves taxonómicas y para la identificación molecular se utilizó la PCR mediante la utilización de primers específicos para *Fusarium graminearum*, definidos en el gen galacto oxidasa (*gaoA*). Se realizó la inoculación puntual de tres cepas de *Fusarium* spp en las espigas de trigo en la etapa de antesis. Todas las variedades de trigo evaluadas presentaron una reacción de resistencia a *Fusarium*, también las tres cepas de *Fusarium* spp. fueron capaces de infectar todos los cultivares de trigo e indujeron los síntomas característicos de la fusariosis de la espiga de trigo (FET). Hubo diferencias altamente significativas entre las cepas en cuanto a la medición de las variables incidencia y severidad. De acuerdo a las características culturales y morfológicas observadas en medio agar hojas de clavel (CLA), las tres cepas fueron identificados dentro del género *Fusarium* pero no se pudo confirmar a que especie pertenecían. No hubo amplificación por PCR con los primers específicos diseñados para *F. graminearum*.

Palabras claves: CLA, fusariosis de la espiga de trigo, *Fusarium* spp., FET.

Abstract:

In Ecuador, one of the factors that limit wheat production are diseases, one of the most important being the disease called “fusariosis” of the ear of wheat. This disease is caused by various species of the fungus *Fusarium* spp. This disease is of great economic importance because it can reduce production by more than 50%. The present research work was carried out in a greenhouse, in order to evaluate the resistance of six wheat varieties previously described as resistant to infection by three strains of *Fusarium* spp. The morphological characterization of the strains was carried out based on taxonomic keys and for molecular identification, PCR was used through the use of specific primers for *Fusarium graminearum*, defined in the galacto oxidase gene (*gaoA*). Punctual inoculation of three strains of *Fusarium* spp., was carried out in wheat ears at the anthesis stage. All the wheat varieties evaluated presented a reaction of resistance to *Fusarium*, also the three strains of *Fusarium* spp. were able to infect all wheat cultivars and induced the characteristic symptoms of Fusarium head blight (TEF). There were highly significant differences between the strains regarding the measurement of the incidence and severity variables. According to the cultural and morphological characteristics observed in carnation leaf agar medium (CLA), the three strains were identified within the genus *Fusarium*, but it was not possible to confirm to which species they belonged. There was no PCR amplification with the specific primers designed for *F. graminearum*.

Keywords: CLA, Fusarium head of wheat, *Fusarium* spp, FET.

Índice

ÍNDICE DE TABLAS.....	6
ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE ANEXOS	8
Abreviaturas y Simbología.....	10
1. INTRODUCCIÓN	15
2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	17
2.1. Objetivo general.....	17
2.2. Objetivos específicos	17
2.3. HIPÓTESIS	17
3. REVISION BIBLIOGRÁFICA	18
3.1. El trigo (<i>Triticum aestivum L.</i>)	18
3.1.1. Origen.....	18
3.1.2. El cultivo de trigo en el Ecuador.....	18
3.2. Fusariosis de la espiga de trigo (FET)	19
3.2.1. Infección	19
2) ascosporas producidas en el interior de los peritecios de <i>G. zeae</i> ,	19
3.2.2. Sintomatología	20
3.2.3. Ciclo de vida de <i>Fusarium graminearum</i>	21
3.2.4. Resistencia genética de trigo (<i>Triticum aestivum L.</i>).....	22
3.3. <i>Fusarium graminearum Schwabe (telemorfo Gibberella zeae)</i>	23
3.4. Caracterización morfológica.....	24
3.5. Caracterización molecular	25
4. MATERIALES Y MÉTODOS	26
4.1. Materiales.....	26

4.2.	Métodos	27
4.2.1.	<i>El área de estudio</i>	27
4.2.2.	<i>Manejo del experimento</i>	27
5.	RESULTADOS.....	37
5.1.	Caracterización morfológica de las tres cepas de <i>Fusarium</i> spp.	38
5.1.1.	<i>Características macroscópicas de las cepas de Fusarium</i> spp.	38
5.1.2.	<i>Características microscópicas de las cepas de Fusarium</i> spp.	41
5.2.	Identificación molecular	45
5.2.1.	<i>PCR para F. graminearum</i>	45
5.3.	Evaluación de la incidencia y severidad de <i>Fusarium</i> spp. en seis variedades de trigo	46
5.3.1.	Incidencia de las tres cepas de <i>Fusarium</i> spp. en las seis variedades de trigo	46
5.3.2.	<i>Severidad de las tres cepas de Fusarium</i> spp. en seis variedades de trigo	49
6.	DISCUSIÓN.....	54
7.	CONCLUSIONES	58
8.	RECOMENDACIONES	59
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
10.	ANEXOS.....	67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Materiales que se utilizaron en la investigación	26
Tabla 2. Sitio de colecta de las cepas de <i>Fusarium</i> spp.	28
Tabla 3. Cebadores a utilizar definido a partir del gen galacto oxidasa (<i>gaoA</i>).....	31
Tabla 4. Variedades que se usaron en las pruebas de patogenicidad y su caracterización de resistencia	32
Tabla 5. Escala modificada para evaluar la fusariosis de la espiga (<i>Fusarium graminearum</i>) en invernadero	35
Tabla 6. Comparación de modelos con varianzas heterogéneas (2) y homogéneas (1) mediante una prueba de razón de verosimilitud	46
Tabla 7. Reacción de las variedades de trigo inoculadas con la cepa 1(<i>Fusarium</i> spp.) mediante el índice de severidad.....	49
Tabla 8. Reacción de las variedades de trigo inoculadas con cepa 2 (<i>Fusarium</i> spp.) mediante el índice de severidad	50
Tabla 9. Reacción de las variedades de trigo inoculadas con la cepa 3 (<i>Fusarium</i> spp.) mediante el índice de severidad.....	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo infeccioso de <i>Fusarium graminearum</i> (<i>Gibberella zeae</i>) en trigo.....	22
Figura 2. Medias recortadas al 20 % del crecimiento del micelio durante 10 días (registradas cada 2 días) por efecto de las cepas y el tiempo.....	39
Figura 3. Aspecto del micelio aéreo de las tres cepas de <i>Fusarium</i> spp. de 25 días de edad crecidos en medio de cultivo PDA (a) cepa 1 (b) cepa 2 (c) cepa 3.....	40
Figura 4. Pigmentación de las cepas de <i>Fusarium</i> spp. de 30 días de edad en medio de cultivo PDA. Imagen superior muestra el anverso (micelio) y la imagen inferior, reverso la pigmentación de cada una de las cepas. (A) cepa 1 (B) cepa 2 y (C) cepa 3.....	41
Figura 5. Cepa 1(M3). A) Monofialides ramificados y no ramificados B) Macroconidios. C) Microconidios a los 30 DDS. D) Clamidosporas intercalares en medio CLA.....	42
Figura 6. Cepa 2 (059B). A) Monofialides simples B) Macroconidios. C) Microconidios a los 30 DDS.....	43
Figura 7. Cepa 3 (04). A) Monofialides simples B) Macroconidios. C) Microconidios a los 30 DDS. D) Clamidosporas intercalares en cadenas en medio CLA.....	44
Figura 8. Efecto de las 3 cepas en cada variedad en la expresión de la incidencia. Promedio de los factores vs. Testigos y promedio del testigo positivo y testigo negativo.....	48
Figura 9. Efecto de las 3 cepas de <i>Fusarium</i> spp., en combinación con las 5 variedades de trigo sobre los síntomas de severidad representados por los diagramas de cajas con los p-valores, más la comparación entre testigos.....	53

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Medio de cultivo Papa-dextrosa-agar (PDA). Fórmula en gramos por litro de agua destilada de agar de dextrosa y papa.	67
Anexo 2. Medio de cultivo Agar Hoja de Clavel (CLA).	67
Anexo 3. Placa petri conteniendo medio de cultivo CLA en la cámara de flujo laminar.	68
Anexo 4. Protocolo de Alvarado, 2010 para la extracción de ADN.	68
Anexo 5. Cuantificaciones de ADN.	69
Anexo 6. Espigas infectadas por las tres cepas de <i>Fusarium</i> spp. de cada una de las seis variedades de trigo evaluadas, a los 21 días post inoculación.	70
Anexo 7. Siembra de variedades e inoculación de conidios de <i>Fusarium</i> spp.	76
Anexo 8. Riego de plantas de trigo mediante sistema de microaspersión.	77
Anexo 9. Observación de conidios de <i>Fusarium</i> spp. en cámara de Neubauer, de 30 días de edad. (A) cepa 1, (B) cepa 2, (C) cepa 3.	78
Anexo 10. Cepas de <i>Fusarium</i> spp. de 30 días de edad en medio de cultivo CLA. Imagen superior muestra el anverso (micelio) y la imagen inferior, reverso la pigmentación de cada una de las cepas. (A) cepa 1 (B) cepa 2 y (C) cepa 3.	78
Anexo 11. Tabla de colores utilizadas para la caracterización morfológica.	79
Anexo 12. Esquema del diseño experimental para el análisis de las 3 cepas (FA) y días (FB), para la variable diámetro del crecimiento del micelio de <i>Fusarium</i> spp.	80
Anexo 13. Arreglo factorial con un DCA, para la variable severidad. Arreglo factorial de 5 variedades (FA) por 3 cepas (FB) más 2 testigos adicionales (17 tratamientos) con 5 repeticiones, con un total de 85 unidades experimentales.	81
Anexo 14. Análisis estadístico de la variable diámetro del micelio de las tres cepas de <i>Fusarium</i> spp., durante 10 días. ANOVA dentro-entre sujetos con medias recortadas al 20%.	82
Anexo 15. Resultados del análisis estadístico de la variable incidencia de las tres cepas de <i>Fusarium</i> spp. Prueba de hipótesis marginales (SC Tipo III) de los efectos fijos, para las cepas de <i>Fusarium</i> spp.	82
Anexo 16. Medias ajustadas y error estándar para el factor variedad de la variable incidencia DGC ($\alpha=0.05$) con la corrección de Bonferroni.	82

Anexo 17. Medias ajustadas y error estándar para el factor cepa de la variable incidencia DGC ($\alpha=0.05$) con la corrección de Bonferroni.	83
Anexo 18. Resultados del análisis estadístico de la variable severidad de las tres cepas de <i>Fusarium</i> spp. Prueba de Levene para homogeneidad de varianza (17 tratamientos).	83
Anexo 19. Análisis de la varianza para la variable severidad con la función “ExpDes” en el programa R de las tres cepas de <i>Fusarium</i> spp.	83
Anexo 20. Efectos simples del factor variedad para la variable severidad Test: Tukey Alpha: $=0.05$ LSD: $=0.61396$. Error: 0.3600 df:68.	84
Anexo 21. Efectos simples del factor cepa para la variable severidad. Test: Tukey Alpha: $=0.05$ LSD: $=0.40663$. Error: 0.3600 df:68.	84

ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

CIMMYT: Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo.

CLA: Agar Hoja de Clavel (carnation leaf agar)

DON: Deoxinivalenol.

ESPAC: Encuesta de superficie y producción agropecuaria continua.

FET: Fusariosis de la espiga de trigo.

GaoA): Gen galacto oxidasa.

INIAP: Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuaria.

PDA: Papa-dextrosa-agar.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

SNA: Spezieller nährstoffarmer agar.

ZEA: Zearalenona.

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Byron Mauricio Padilla Romero, en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Evaluación de la resistencia de seis variedades de trigo (*Triticum aestivum* L.) a tres cepas de *Fusarium* spp.", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 07 de diciembre de 2022



Byron Mauricio Padilla Romero

C.I: 0350116463

Cláusula de Propiedad Intelectual

Byron Mauricio Padilla Romero, autor del trabajo de titulación "Evaluación de la resistencia de seis variedades de trigo (*Triticum aestivum* L.) a tres cepas de *Fusarium* spp." certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 07 de diciembre de 2022



Byron Mauricio Padilla Romero

C.I: 0350116463

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme fortaleza, dedicación, paciencia para poder salir adelante y nunca dejarme caer en los momentos difíciles. Mi más sincero agradecimiento a mi tutor de tesis el Ing. Patricio Castro PhD. por su valiosa dirección, asesoría y apoyo incondicional en el desarrollo del presente trabajo de investigación. De igual manera agradezco también a todo el personal que conforman el INIAP, de manera especial a los Ing. Jorge Coronel e Ing. Catalina Bravo por el apoyo y colaboración para la realización de este trabajo. Agradezco también al Ing. Walter Larriva, Dr. Guillermo Guevara y Blga. Denisse Peña, por formar parte en la ejecución de este trabajo de investigación. A mis docentes por sus enseñanzas, apoyo, experiencias y soporte durante mi época universitaria, que me han ayudado a crecer como ser humano y en el ámbito profesional.

Mauricio Padilla R.

DEDICATORIA

A Dios porque siempre ha cuidado de mis pasos, por darme la vida y la tenacidad de culminar cinco años de estudio, dedico este trabajo de graduación a mis queridos padres Oswaldo y Flor y a mis dos hermanos Edwin y Brando, quienes estuvieron siempre en cada instante apoyándome con sus valores y motivación incondicional.

Mauricio Padilla R.

1. INTRODUCCIÓN

El trigo ha formado parte del desarrollo económico y cultural del hombre, constituye el cultivo más antiguo sembrado en inmensas extensiones y grandes cantidades, debido a su amplio rango de adaptación y elevado consumo en muchos países. Se encuentra entre los cereales de mayor producción mundial junto con el arroz, maíz y cebada (Moreno et al., 2001). A nivel mundial uno de los factores que limitan la producción de trigo son las enfermedades, siendo uno de las más importantes la enfermedad denominada fusariosis de la espiga, la cual es causada por varias especies de hongos pertenecientes a dos géneros: *Microdochium* y *Fusarium*; siendo frecuentemente *F. graminearum* la especie más predominante en muchas de las regiones afectadas a nivel mundial (Ernst, 2007).

La fusariosis de la espiga es una de las enfermedades más importantes de la Sierra en el Ecuador (INIAP, 2011). Esta enfermedad es producida por varias especies del hongo *Fusarium* spp, los cuales se encuentran principalmente en el suelo y en restos de cultivos. Esta enfermedad tiene gran importancia económica debido a que puede reducir la producción en más de un 50% y desmejora el valor alimenticio y calidad del grano (Villa-Martínez y col., 2014). Además, si el grano cosechado posee más de un 5% de granos infectados puede tener toxinas tales como: deoxinivalenol (DON) y zearalenona (ZEA), responsables de enfermedades graves en humanos y animales (INIAP, 2011). Sin embargo, en la sierra ecuatoriana no se ha precisado que especie de *Fusarium* es el principal patógeno responsable de la enfermedad, manifestándose que la enfermedad es producida por varias especies del hongo *Fusarium* spp (INIAP, 2011).

Clásicamente la identificación de hongos se ha realizado en base a criterios morfológicos, la caracterización morfológica en el género *Fusarium* se basa en las características macro y microscópicas del cultivo. El tipo de micelio aéreo, pigmentación y tasa de crecimiento de la colonia, así como la ausencia o presencia de microconidios, clamidosporas en diferentes medios de cultivo, son características básicas de identificación. El color que desarrollan depende de la especie, los cuales pueden ser blanco, crema, rojo, púrpura, etc., coloraciones que pueden variar según los diferentes medios de cultivo. El micelio aéreo suele ser abundante y de aspecto algodonoso (Leslie y Summerell, 2006). Además, en los últimos años se ha extendido el uso de técnicas moleculares para la identificación y detección de los hongos implicados en la fusariosis de la espiga de trigo (FET), la mayoría de estas se basan en la técnica reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con primers específicos (Nicholson y col., 1998). La PCR ofrece una sensibilidad y especificidad para detectar, identificar y cuantificar las especies presentes en los tejidos vegetales y se basan en comparación de secuencias de ADN del hongo a identificar (Guarro y col., 1999).

Generalmente el manejo de la fusariosis de la espiga en trigo se realiza mediante el uso de agroquímicos, sin embargo, esto representa un grave riesgo para la salud humana y contribuye al aumento de la contaminación al medio ambiente (Villa-Martínez y col., 2014). Además, ha dado lugar a la aparición de cepas altamente resistentes que conducen al aumento de enfermedades fúngicas con mayor incidencia (Naeini y col., 2010). Por lo tanto, es necesario buscar y adoptar estrategias que sean accesibles y no tóxicas para mejorar el manejo y producción de trigo, siendo el mejoramiento genético la principal alternativa para el manejo de la enfermedad, para mitigar y evitar el uso excesivo de fungicidas. Por lo tanto

es necesario avanzar en investigaciones sobre evaluación de resistencia, debido a que la resistencia del huésped es considerada el medio más adecuado para controlar la enfermedad (Mendes y col., 2018), lo cual contribuirá a que este cultivo sea un rubro rentable, eficiente y sostenible (Reyes, Delgado, y García, 2010).

2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1. Objetivo general

- Evaluar la resistencia de seis variedades de trigo a la infección de tres cepas de *Fusarium* bajo condiciones de inoculación artificial.

2.2. Objetivos específicos

- Realizar la caracterización morfológica de los aislamientos de *Fusarium* para identificar la especie responsable de fusariosis de la espiga en trigo.
- Identificar la especie responsable de la enfermedad denominada fusariosis de la espiga en trigo, mediante PCR.
- Evaluar la incidencia y severidad de tres cepas de *Fusarium* en seis variedades de trigo.

2.3. HIPÓTESIS

- **H₀**: Ninguna de las variedades de trigo evaluadas presentan resistencia a *Fusarium* spp.
- **H_a**: Al menos una de las variedades de trigo evaluadas presenta resistencia a *Fusarium* spp.

3. REVISION BIBLIOGRÁFICA

3.1. El trigo (*Triticum aestivum L.*)

3.1.1. Origen

El trigo (*Triticum aestivum L.*) tiene sus orígenes en la antigua Mesopotamia específicamente en Asia menor, Asia Central y África. Existen también indicios que sugieren que probablemente tuvo sus orígenes en el área llamada Creciente Fértil entre el Tigris y el Éufrates y que empezaron a cultivarse entre los años 600 a 800 a.C. o quizá en tiempos aún más remotos. Actualmente se cultiva en todos los continentes y la producción mundial ha aumentado constantemente en los últimos años (Villareal, 2000).

3.1.2. El cultivo de trigo en el Ecuador

El trigo (*Triticum aestivum L.*) es uno de los cereales más importantes a nivel mundial, siendo el cultivo más sembrado. En el Ecuador el trigo conjuntamente con el arroz y la cebada, son los cereales de mayor importancia por ser parte de la alimentación básica de las familias de la sierra ecuatoriana (INIAP, 2011). El consumo nacional de trigo supera las 450000 t/año, resultando en un consumo per cápita superior a los 35 kg/año. Sin embargo, el Ecuador importa el 98% de los requerimientos internos de trigo y tan solo el 2% (9000 t) es producido a nivel local (Falconi, 2008).

Las áreas de producción de trigo se distribuyen a lo largo del callejón Interandino en zonas comprendidas entre los 2000 a 3200 metros de altura. Según los datos del ESPAC se tiene que el año 2018 la superficie cosechada del cultivo de trigo fue de 3149 ha distribuidas en la Región Sierra, con una producción total de 5398 Tm. Las principales provincias que se dedican a este cultivo son: Azuay, Bolívar, Carchi, Cotopaxi, Chimborazo, Imbabura y Pichincha. La provincia de Carchi es la que posee la mayor producción con 1868 Tm. En la

provincia del Azuay se registra una superficie cosechada de 122 ha con una producción de 72 Tm de este cultivo (INEC, 2018).

3.2. Fusariosis de la espiga de trigo (FET)

La fusariosis de la espiga de trigo (FET) es una enfermedad fúngica muy importante que afecta a varias especies gramíneas, se ha convertido en una de las enfermedades más importantes en el cultivo de trigo a nivel mundial (Lofgren y col., 2018). Esta enfermedad es responsable de importantes pérdidas económicas directas, debido a que provoca la reducción del rendimiento y calidad física e industrial del grano (granos arrugados o abortados, decolorados y pérdida de peso). También provoca pérdidas indirectas debido principalmente a la contaminación de granos con micotoxinas como: deoxinivalenol (DON) y zearalenona (ZEA), que son nocivas para la salud, ocasionando su rechazo o descalificación durante el proceso de comercialización. El factor ambiental es el principal condicionante para la FET, por lo tanto, esta enfermedad afecta la producción de trigo cuando ocurren condiciones climáticas favorables (lluvias frecuentes, periodos de tiempo templado-cálido y húmedo) durante la floración y llenado de grano (Pereyra y Acosta, 2014).

3.2.1. Infección

El proceso de infección de *F. graminearum* en el trigo se puede iniciar con:

- 1) macroconidios producidos sobre esporodoquios o en forma individual,
- 2) ascosporas producidas en el interior de los peritecios de *G. zaeae*,
- 3) clamidosporas que persisten en el suelo o sobre los residuos, aunque este tipo de inóculo es menos frecuente,
- 4) el micelio que sobrevive sobre los restos de maíz o trigo (Ireta y Gilchrist, 1994).

3.2.2. Sintomatología

En los cultivos de trigo los primeros síntomas de fusariosis de la espiga se producen poco después de la floración, se ubican en las primeras espigas que alcanzan la antesis, se manifiesta con pequeñas machas marrones y húmedas sobre las glumas, seguida por una decoloración por pérdida de clorofila en la espiga. Generalmente la primera manifestación de la enfermedad surge en la zona media de la espiga o el tercio superior, es decir entre la base y la mitad de las glumas o en el raquis. El inoculo principal está constituido por los macroconidios o ascosporas que son diseminadas por el viento y la lluvia (Mourellos, 2015).

La espiguilla infectada se cubre de micelio blanco y de una gran cantidad de esporas asexuales en masas extensas y de color rosa o salmón/naranja intenso de conidios asexuales denominados macroconidios y esporodoquios. El síntoma más severo es el resultante del crecimiento fúngico dentro del raquis. El hongo bloquea la translocación de agua y nutrientes y como consecuencia, la espiga adquiere la apariencia de madurez prematura (necrosis de los tejidos). También puede aparecer la forma sexual manifestándose como puntuaciones negras (peritecios) (Nicholson y col., 2007).

Cuando la infección es fuerte los granos dañados son cubiertos por el micelio del hongo y toman una apariencia de una masa algodonosa de color rosa. Si la severidad del ataque es moderada los granos pueden quedar chupados y bajos de peso, además pueden tomar una coloración blanquecina, pudiendo originar también granos contaminados con toxinas (Ireta y Gilchrist, 1994).

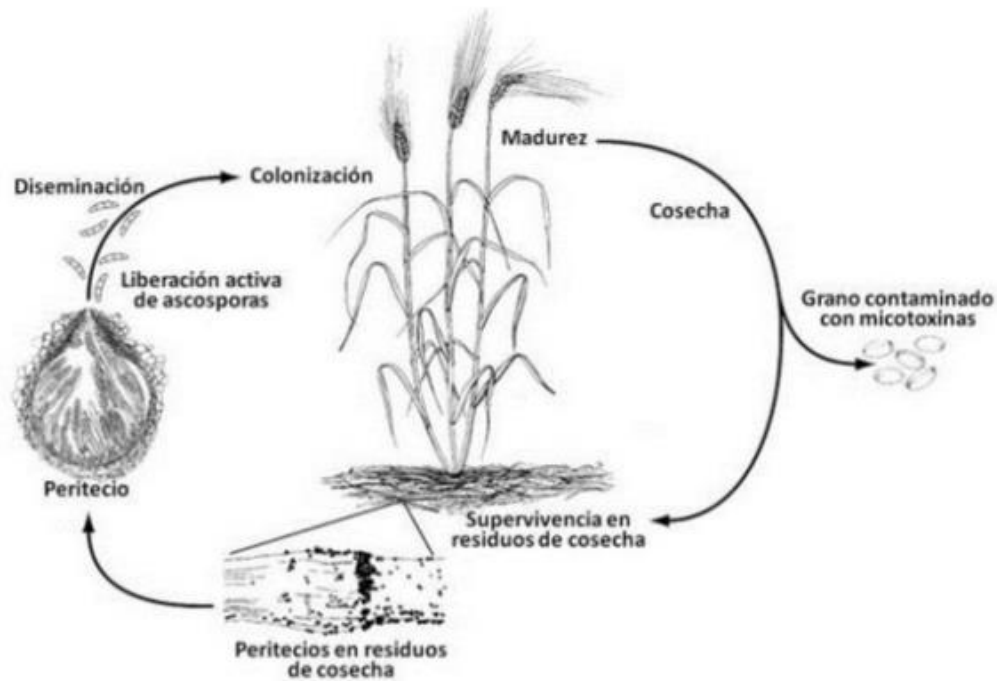
3.2.3. *Ciclo de vida de Fusarium graminearum*

Fusarium graminearum es el principal agente causal de fusariosis de la espiga en trigo. En el gráfico 1 se ilustra el proceso mediante el cual este patógeno coloniza las espigas de trigo para producir la enfermedad. *Fusarium graminearum* es un hongo que tiene la capacidad de desarrollarse saprofiticamente sobre los residuos de plantas infectadas que permanecen en el suelo después de realizada la cosecha, sobre estos residuos el hongo produce esporas asexuales (macroconidias) que son livianas y se dispersan fácilmente, ayudadas por el viento y por la lluvia. Cuando se presentan condiciones ambientales cálidas y de alta humedad, el hongo puede desarrollar su estado sexuado (*Gibberella zeae*), formando peritecios que contienen ascosporas (esporas sexuales) en su interior. Estas ascosporas son expulsadas desde los peritecios y se diseminan, principalmente, por el viento. Ambos tipos de esporas, macroconidias y ascosporas, se pueden depositar sobre las espigas de trigo e iniciar el proceso de infección, el periodo de mayor susceptibilidad de las espigas de trigo a la infección es durante la antesis (floración). Una vez que las esporas se depositan sobre las espiguillas, comienzan a germinar. Para esto, el hongo requiere condiciones de humedad y temperatura (20–30°C) para favorecer el crecimiento de las hifas (Caro, 2015).

El modelo de colonización se basa en la entrada del patógeno a través de anteras expuestas, seguido por la penetración del ovario y las infecciones sucesivas de las brácteas florales (Pritsch et al., 2000). Luego de esta etapa el hongo se puede diseminar a las espiguillas superiores o inferiores de una misma espiga, a través del raquis. Las espiguillas infectadas son estériles, y los granos se tornan de color rosado, también los granos aparentemente sanos también pueden estar infectados, especialmente si la infección se presentó en etapas tardías del desarrollo del grano (Wegulo et al., 2013).

Figura 1

Ciclo infeccioso de Fusarium graminearum (Gibberella zae) en trigo



Nota. Ciclo de la fusariosis de la espiga de trigo ocasionada por Fusarium graminearum (Gibberella zae). Fuente: (Malaissi, 2016).

3.2.4. Resistencia genética de trigo (*Triticum aestivum* L.)

La selección de los genotipos por su respuesta a las infecciones de *F. graminearum* se debe realizar en condiciones semicontroladas y de campo. La identificación de materiales con resistencia se dificulta debido incluso por pequeñas diferencias en el ciclo vegetativo de los genotipos evaluados, los cuales determinan diferencias en la infección del patógeno (Ireta y Gilchrist, 1994).

La resistencia del trigo a la fusariosis se clasifica en tres tipos:

- a) Resistencia Tipo I o de penetración: La planta ofrece resistencia a la infección inicial, por lo tanto, el patógeno no puede penetrar en los tejidos del hospedero.
- b) Resistencia Tipo II o de invasión: El patógeno logra penetrar en el hospedero, pero las hifas del hongo no pueden invadir las células adyacentes al punto de penetración.
- c) Resistencia Tipo III o bioquímica: Es la habilidad de algunos genotipos de degradar toxinas, como el deoxinivalenol, producidas por el hongo. Los genotipos más resistentes pueden tolerar altas concentraciones de metabolitos tóxicos (Ireta y Gilchrist, 1994).

3.3. *Fusarium graminearum* Schwabe (teleomorfo *Gibberella zeae*)

Fusarium graminearum (teleomorfo: *Gibberella zeae*), perteneciente al Phylum Ascomycota, orden Hypocreales, familia Hypocreaceae). Es un hongo que tiene la capacidad de desarrollarse saprófitamente sobre los residuos de plantas infectadas que permanecen en el suelo después de la cosecha (Ulloa, Hanlin, y Lo Herrera-Suárez, 2006).

Las especies de este género *Fusarium* pueden producir tres tipos de esporas asexuales llamadas macroconidios, microconidios y clamidosporas. Las principales características que presenta *F. graminearum* son los esporodoquios, estos son escasos y presentan un color naranja pálido. Los macroconidios presentan formas y tamaños diverso según la especie, son delgados en forma de hoz de 2,5 x 35-63 μm , conteniendo entre 5 a 6 septos, pueden originarse a partir de estructuras especializadas los esporodoquios, como así también en monofiálides, polifiálides o directamente a partir del micelio aéreo. Esta especie no presenta microconidios. Las clamidosporas son globosas y miden entre 10 a 12 μm de diámetro, es un

hongo homotálico (el único dentro de este género). Cuando se presentan condiciones de alta calidad y de alta humedad el hongo puede desarrollar su estado sexuado (*Gibberella zae*), formando peritecios (presentan un color negro) que contienen ascosporas (esporas sexuales) en su interior (S. A. Pereyra, Dill-Macky, y Sims, 2004), (Wolfgang y Nirenberg, 1982).

3.4. Caracterización morfológica

La clasificación morfológica en el género *Fusarium* se basa principalmente en las características macro y microscópicas del cultivo. El tipo de micelio aéreo, pigmentación y tasa de crecimiento de la colonia, así como la presencia o ausencia de esporodoquios, esclerocios o estroma en diferentes medios, se consideran características secundarias de identificación. El color que desarrollan las colonias depende principalmente de la especie y puede ser blanquecino, crema, anaranjado, rosa, rojizo, púrpura, etc. Estas coloraciones pueden variar según los diferentes medios de cultivo. El micelio aéreo suele ser abundante y de aspecto algodonoso (Nelson et al., 1994).

Entre los medios de agar más utilizados para la identificación de especies de *Fusarium* se encuentran: agar hojas de clavel (CLA), spezieller nährstoffarmer agar (SNA), y agar papa dextrosa (PDA). El empleo de CLA favorece la producción de conidias por sobre el crecimiento de micelio. Al utilizar este medio de cultivo, las macroconidias tienen un tamaño y forma más uniforme, razón por la cual se consideran más adecuadas para realizar la identificación morfológica. El medio de PDA se usa mayormente para evaluar la morfología, pigmentación y velocidad de crecimiento de las colonias (Leslie y Summerell, 2006).

3.5. Caracterización molecular

Varias pruebas de diagnóstico molecular han sido desarrolladas para la identificación y detección de hongos del género *Fusarium*. La introducción de técnicas moleculares de identificación basadas en ADN, en general estas técnicas son más específicas, objetivas, sensibles, seguro y rápidas que los métodos tradicionales; que en pocos pasos permite determinar identidad a nivel de especie. La mayoría de estos métodos se basan en la técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR) con primers específicos (Caro, 2015). Básicamente, se basan en comparación de secuencias de ADN del hongo a identificar, con secuencias de especies conocidas. se utiliza el ADN como código de barras para la identificación de un aislamiento de un hongo desconocido utilizando una corta secuencia de ADN que permite asignarlo a una especie específica o a un grupo de especies (Gherbawy y Voigt, 2010).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales

Tabla 1

Materiales que se utilizaron en la investigación

Biológicos	Físicos	De laboratorio
– Semillas de trigo	– Libro de campo	– Cajas Petri
– Cepas de <i>Fusarium</i>	– Etiquetas de identificación	– Bisturí
	– Sustrato estéril	– Mechero de alcohol
	– Fundas plásticas	– Vasos de Precipitación
	– Macetas (25cm de diámetro)	– Erlenmeyer
	– Computador	– Puntas de micro pipetas
		– Guantes
		– Mascarilla
Equipos	Reactivos	Programas
– Autoclave	– Agar Papa y Dextrosa (PDA)	– Infostat
– Refrigeradora	– Gel de agarosa	– Software Excel
– Centrifugadora	– Agua destilada	– Software R
– Balanza de precisión	– Bromuro de Etidio	
– Balanza analítica	– Primers	
– Micropipetas		
– Agitador Vortex		
– Cámara de flujo		
– Cámara de electroforesis		
– Cámara de Neubauer		
– Termociclador		
– Microscopio		

Fuente: Autor

4.2. Métodos

4.2.1. *El área de estudio*

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, de la Universidad de Cuenca, Campus Yanuncay, ubicada en el sector de Yanuncay, con una altura aproximada de 2567 m.s.n.m. con coordenadas UTM -2.9201568,-79.025173; y, en el laboratorio del Departamento de Protección Vegetal de la Estación Experimental Austro del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), los mismos que disponen de los equipos y espacios adecuados para la ejecución del trabajo investigativo. En cuanto a la investigación en campo esta se llevó a cabo en el invernadero de la Estación Experimental del Austro, Gualaceo, Sector Bullcay del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP).

4.2.2. *Manejo del experimento*

4.2.2.1. **Metodología para la investigación experimental del objetivo 1:**

Caracterización morfológica.

4.2.2.1.1. **Obtención del inóculo.**

Las cepas de *Fusarium* spp. que se utilizaron en el presente estudio provinieron de espigas de trigo que presentaron sintomatología de fusariosis de la espiga, pertenecientes a tres localidades diferentes de las provincias de Chimborazo, Azuay y Cañar (Tabla 2), las cuales fueron proporcionadas por el Departamento de Protección Vegetal de la Estación Experimental del Austro, Gualaceo, Sector Bullcay del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), las mismas que se encontraban conservadas en tubos Eppendorf con glicerol 10% a 4 °C.

Tabla 2

Sitio de colecta de las cepas de Fusarium spp.

Cepa	Código de muestra	Provincia de colecta
1	M3	Chimborazo
2	059B	Azuay
3	04	Cañar

Fuente: Autor

4.2.2.1.2. Siembra de cepas de *Fusarium* spp.

Para la siembra de las cepas de *Fusarium* spp., se tomó una porción de cada cepa contenida en un tubo Eppendorf y se colocó en el centro de una caja de Petri de 10 cm de diámetro con medio PDA utilizando una aguja estéril. Luego las cajas se sellaron con parafilm y fueron incubadas durante 25 días a temperatura ambiente con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas. Transcurrido el tiempo de incubación las cepas que presentaron crecimiento fúngico fueron traspasados a nuevas cajas de Petri con medio agar papa dextrosa (PDA), y se incubaron nuevamente bajo las mismas condiciones (Ortega, 2017).

4.2.2.1.3. Obtención de cultivos monospóricos.

Para la obtención de las cepas completamente puros, se siguieron los siguientes pasos: a partir de los cultivos de 25 días de edad en medio PDA, se realizaron cortes de 1 cm de diámetro con un bisturí y se las traspasó a un Eppendorf de 1.5 ml con 0.5 ml de agua destilada estéril. Después se tomó 0.5 ml de dicha suspensión y se la vertió en una caja Petri de 10 cm de diámetro con medio PDA, dispersándola con la ayuda de una varilla de vidrio estéril. Las cajas fueron incubadas a temperatura ambiente y en

oscuridad durante 72 horas, para que los conidios germinaran. Se observaron los cultivos bajo el estereoscopio para identificar los conidios germinados y se transfirieron individualmente a cajas de Petri con medio PDA, con la ayuda de una aguja previamente esterilizada (Gilchrist y col., 2005). Las cajas fueron colocadas en una cámara a temperatura ambiente con alternancia de luz/oscuridad de 12 horas, para de esta manera proporcionarles condiciones apropiadas para el crecimiento y esporulación de los conidios de *Fusarium* spp. (Ortega, 2002).

4.2.2.1.4. Caracterización morfológica.

La identificación de las cepas de *Fusarium* spp. se realizó a partir de cultivos monospóricos de 30 días de edad crecidos en medio de cultivo agar hojas de clavel (CLA). Después se realizaron preparaciones de lactofenol al 10% y se observaron al microscopio compuesto con un objetivo de 40X (Lorenzo, 2018).

En primer lugar, se observaron las características macroscópicas de las colonias, observando la tasa de crecimiento, pigmentación del anverso y reverso de la caja Petri y aspecto del micelio aéreo. Posteriormente se tomó una pequeña porción de micelio del hongo y se observó bajo el microscopio la morfología de las células conidiógenas, la presencia – ausencia y forma de microconidios, morfología de los macroconidios y presencia y ausencia de clamidosporas. Las cepas pertenecientes al género *Fusarium* spp., fueron identificados con base en la morfología de las estructuras observadas y con la ayuda de las claves taxonómicas de Gerlach y Nirenberg, (1982), Nelson, Toussoun, y Marasas (1983) y Leslie y Summerell (2006).

4.2.2.2. Metodología para la investigación experimental del objetivo 2:

Caracterización molecular.

4.2.2.2.1. Extracción del ADN genómico de las cepas de *Fusarium* spp.

Para realizar el análisis molecular se procedió a la extracción de ADN, a partir del micelio de las tres cepas de *Fusarium* spp. evaluadas. El procedimiento utilizado para la extracción del ADN genómico fue el descrito por (Alvarado, 2010) con algunas modificaciones. El ADN extraído se almacenó a -20 °C.

4.2.2.2.2. Cuantificación de ADN.

Las concentraciones de ADN de las cepas de *Fusarium* spp. se cuantificaron en un espectrofotómetro (EPOCH) y se diluyeron a una concentración final de 50 ng/μl para la amplificación por PCR. Se utilizó 2 μl de ADN stock de cada cepa.

4.2.2.2.3. Secuencias de primers.

Se emplearon varios pares de primers para la identificación molecular. Las secuencias de primers utilizados se muestran en la (Tabla 3), los cuales fueron tomados del artículo publicado por (Biazio y col., 2008), definidos a partir del gen galacto oxidasa (*gaoA*). La combinación de primers que se utilizó fue: *gaoA1F/gaoA1R*; *gaoA2F/gaoA2R*; *gaoA3F/gaoA3R*; *gaoA4F/gaoA1R* y *gaoA5F/gaoA2R*.

Tabla 3

Cebadores a utilizar definido a partir del gen galacto oxidasa (gaoA)

Primer gaoA F	Secuencias (5'→3')
<i>gaoA1</i> F	ACCTCTGTTGTTCTTCCAGACGG
<i>gaoA2</i> F	TCAGCAAACGGTCCTTAGTGTAT
<i>gaoA3</i> F	GTTCTTCATCTGCCAGTATCACC
<i>gaoA4</i> F	GTTCCACACCTCTGTTGTTCTTC
<i>gaoA5</i> F	CAGCAAACGGTCCTTAGTGTATC
Primer gaoA R	Secuencias (5'→3')
<i>gaoA1</i> R	CTGGTCAGTATTAACCGTGTGTG
<i>gaoA2</i> R	AACATAGACAAGCCGTTGACATT

Fuente: Autor

4.2.2.2.4. Reacción PCR.

Las reacciones de amplificación fueron realizadas en un termociclador Eppendorf Mastercycler NexusGSX1. Para la reacción se empleó la metodología de (Biazio y col., 2008). Se utilizaron 2 ul de ADN genómico en un volumen de reacción final de 25 µl, buffer 1X, MgCl₂, mM, dNTPs, primers (F y R), Taq polimerasa y agua estéril. La separación de las bandas para cada producto de PCR se realizó en gel de agarosa al 1 % (p/v) en buffer TAE 1X, a 90 voltios durante 40 minutos. En el gel se incluyó un marcador de peso molecular (PROMEGA de 1 kp de peso) como referencia para estimar el tamaño de los fragmentos de ADN amplificados.

4.2.2.3. Metodología para la investigación experimental del objetivo 3:

Evaluación de la incidencia y severidad.

4.2.2.3.1. Siembra de variedades.

Se utilizaron 6 variedades de trigo, proporcionados por el Programa de Cereales de la Estación Experimental del Austro, del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). En la tabla 4 se presentan las variedades y la caracterización de resistencia o susceptibilidad al ataque *de Fusarium* de la espiga.

Tabla 4

Variedades que se usaron en las pruebas de patogenicidad y su caracterización de resistencia

VARIETADES	HISTORIA DE SELECCIÓN	COMPORTAMIENTO
– INIAP-COJITAMBO 92	– México (CIMMYT)	– Susceptible
– INIAP-IMBABURA 2014	– CM 81812-12Y-06PZ-4Y- 1M-0Y-5M-0Y-3SJ-OY-0E- 0E-0E-0E.	– Resistencia parcial
– INIAP-SAN JACINTO 2010	– CMSS93Y004S-18Y-3B- 3Y-0100B-0E.	– Resistencia parcial
– INIAP-VIVAR 2010	– México (CIMMYT)	– Resistente
– INIAP-MIRADOR 2010	– Cruza: TINAMOU/MILAN (INIAP)	– Resistente
– INIAP CHIMBORAZO (Testigo)	– Cruzamiento de: SONORA 64A – SELKIRK6/ANDES3 x MARROQUI/RENOWN2 x BONZA2	– Susceptible

Fuente: Autor

Bajo condiciones de invernadero las variedades se sembraron en macetas con suelo previamente esterilizado; el cual consistió en una mezcla de dos partes de suelo franco arenoso, una parte de tierra agrícola y una parte de abono orgánico(turba). Antes de la siembra el suelo fue fertilizado con Fosfato diamónico (18-46-0). Por cada maceta se colocaron 5 semillas para asegurar la emergencia de las mismas, después a los 20 días después de la siembra se realizó un raleo para obtener tres plantas por maceta. Se sembraron un total de 85 macetas, 15 macetas por cada variedad; cada cepa de *Fusarium* spp., se inoculó en una espiga por planta, durante la etapa de anthesis (Lorenzo, 2018).

4.2.2.3.2. Preparación del inóculo.

A partir de cultivos de *Fusarium* spp. crecidos en cajas de Petri con medio de cultivo PDA de 30 días, se procedió a raspar con un bisturí el micelio de toda la periferia de las cajas Petri, los cuales fueron transferidos a vasos de precipitación de 100 ml conteniendo 20 ml de agua destilada estéril. Después la suspensión de conidios se filtró a través de una gasa estéril para retener los residuos de micelio (Gilchrist y col., 2005).

Utilizando una cámara de Neubauer se contó el número de conidios de cinco campos (1,2 ,3 ,4 y 5) con tres repeticiones, y con la información obtenida se ajustó a una concentración de $1,5 \times 2 \times 10^6$ conidios/ ml (Feng, Liu, y Tang, 2018).

4.2.2.3.3. Inoculación de conidios.

Las espigas de trigo cultivadas en invernadero fueron inoculadas mediante el método de inoculación puntual en plena anthesis, debido a que en esta etapa es cuando las espigas son más susceptibles al ataque de *Fusarium* (Feng y col., 2018). Para ello mediante el uso de una micropipeta se inyectó una suspensión de conidios de (1,5

x 2×10^6 conidios/ml), al flósculo en el medio de la lemma y palea de la quinta espiguilla desde la base de la espiga. Luego de la inoculación para favorecer la germinación de los conidios cada espiga se cubrió con papel glasine para mantener una humedad relativa alta y una temperatura elevada, el papel glasine se retiró a las 36 h después de la inoculación. Cada cepa se inoculó en una espiga de cada planta, 3 plantas por maceta, con un total de 15 macetas por cada cepa de *Fusarium* spp. Además, se incluyó un tratamiento control que consistió en la inoculación de (combinación de inóculos) y agua destilada estéril.

4.2.2.3.4. Variables a ser evaluadas.

La magnitud de los síntomas de la fusariosis de la espiga se evaluó a los 12, 17 y 21 días posteriores a la inoculación, a través de dos variables patométricas: Incidencia y Severidad. Estas variables fueron cuantificadas a través de un conteo con el fin de caracterizar el nivel de desarrollo de la enfermedad (Ireta y Gilchrist, 1994).

Incidencia: Se determinó el número de espigas enfermas sobre el total de espigas evaluadas:

$$\text{Incidencia} = \frac{\# \text{ de espigas enfermas}}{\text{Total de espigas evaluadas}} \times 100$$

Severidad: Se contó el número total de espiguillas y el número total de espiguillas enfermas (con presencia de al menos un grano enfermo). Usando esos valores se calculó para cada espiga el porcentaje de severidad utilizando la siguiente formula:

$$\text{Severidad} = \frac{\# \text{ de espiguillas enfermas}}{\text{Total de espiguillas en cada espiga}} \times 100$$

La reacción de las variedades de trigo se determinó utilizando la escala propuesta por el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT, 1994), que se anota en la (Tabla 5).

Tabla 5

*Escala modificada para evaluar la fusariosis de la espiga (*Fusarium graminearum*) en invernadero*

ESCALA	REACCION	% INFECCION
0	Inmune	0
1	Resistente	1-8
2	Moderadamente resistente	9-11
3	Moderadamente susceptible	12-20
4	Susceptible	21-50
5	Muy susceptible	>50

Fuente: (CIMMYT, 1994)

4.2.2.3.5. Diseño experimental.

Se evaluó la resistencia de seis variedades de trigo: INIAP-COJITAMBO 92, INIAP-IMBABURA 2014, INIAP-SAN JACINTO 2010, INIAP-VIVAR 2010, INIAP-MIRADOR 2010, y la variedad INIAP CHIMBORAZO, la misma que se utilizó como testigo susceptible. La variable diámetro de crecimiento del micelio de las tres cepas de *Fusarium* durante 10 días, con datos registrados cada 2 días, se analizó bajo un análisis bifactorial de medidas repetidas de tres cepas (FA) y 5 días (FB) con 4 repeticiones,

obteniendo 60 unidades experimentales, el cual se analizó en un diseño completamente al azar con 4 repeticiones (Anexo 12).

Para evaluar los resultados de la variable Incidencia en las espigas de trigo se procedió a realizar un análisis mediante el uso de modelos mixtos, a través de la interfase de InfoStat con la plataforma de R.

Para el análisis de la variable Severidad se procedió a realizar la prueba de ANOVA con la prueba de Tukey al 5 %, el arreglo factorial fue de 5 variedades por 3 cepas más 2 testigos adicionales (17 tratamientos) con 5 repeticiones cada uno, dando un total de 85 unidades experimentales, las mismas que estaban conformadas por tres plantas contenidas en una maceta, teniendo un total de 255 plantas. El testigo positivo (TP) fue la variedad INIAP Chimborazo (variedad susceptible) con inoculación (combinación de inóculos) y el testigo negativo (TN), inoculado con agua destilada, (Anexo 13). El análisis estadístico se realizó mediante el uso del lenguaje de programación R con el paquete ExpDes.

5. RESULTADOS

A continuación, se presenta la caracterización morfológica de tres cepas de *Fusarium* spp. que ocasionan la fusariosis de la espiga de trigo, también se presentan los resultados de la evaluación de la resistencia de seis variedades de trigo ante la infección de tres cepas de *Fusarium* spp. inoculadas en las espigas de trigo, mediante el análisis de las variables incidencia y severidad, además se evaluó la variable diámetro del micelio de las tres cepas de *Fusarium* spp. durante 10 días.

Para el análisis de la variable Incidencia en las espigas de trigo, se procedió mediante el uso de modelos mixtos, como sugiere (Hyndman, 2010), debido a que esta variable presenta valores ceros que dificultan normalizar la variable por transformación de datos. Se analizó con InfoStat, el cual implementa una interfaz amigable de la plataforma R para estimar modelos lineales extendidos y mixtos (Di Rienzo et al. 2017).

Los resultados de la variable severidad se evaluaron a los 12, 17 y 21 días después de la inoculación. Sin embargo, debido a que los síntomas de la enfermedad se presentaron únicamente en el punto de inoculación y no hubo dispersión de los síntomas desde el punto de inoculación hacia la base y el ápice de la espiga, se analizó únicamente el dato final (21 días) para el análisis. La combinación de la variedad I_Imbabura_2014 con la cepa 3 y el testigo negativo (INIAP_ Chimborazo) presentaron valores 0 de severidad, por lo que se optó por encontrar el valor mínimo para ser un valor atípico a través de la determinación de los valores del primero, tercer cuartil y el rango intercuartílico multiplicado por el valor de 2.2 de acuerdo con lo sugerido por Hoaglin y Iglewicz, (1987). Se identificó que el valor de 1.831 es el valor más bajo para ser atípico, por lo que se decidió sustituir el valor más cercano, que es 1.84, para conseguir homogeneidad de varianzas.

5.1. Caracterización morfológica de las tres cepas de *Fusarium* spp.

5.1.1. Características macroscópicas de las cepas de *Fusarium* spp.

5.1.1.1. Diámetro del crecimiento diario del micelio con prueba de significación para las tres cepas de *Fusarium* spp.

El ANOVA para el análisis con medidas repetidas para la variable diámetro de crecimiento diario del micelio de las tres cepas de *Fusarium* durante 10 días, registrando el crecimiento cada 2 días, se configura hacia los diseños mixtos. Es decir, tenemos efectos dentro de los sujetos (debido a mediciones repetidas de los días) y efectos entre sujetos (comparaciones de grupos de las cepas). La función principal del WRS2 para calcular un ANOVA entre sujetos con medias recortadas es “bwtrim”. Los datos del análisis fueron ajustados a un ANOVA dentro-entre sujetos con medias recortadas al 20% (Anexo 14).

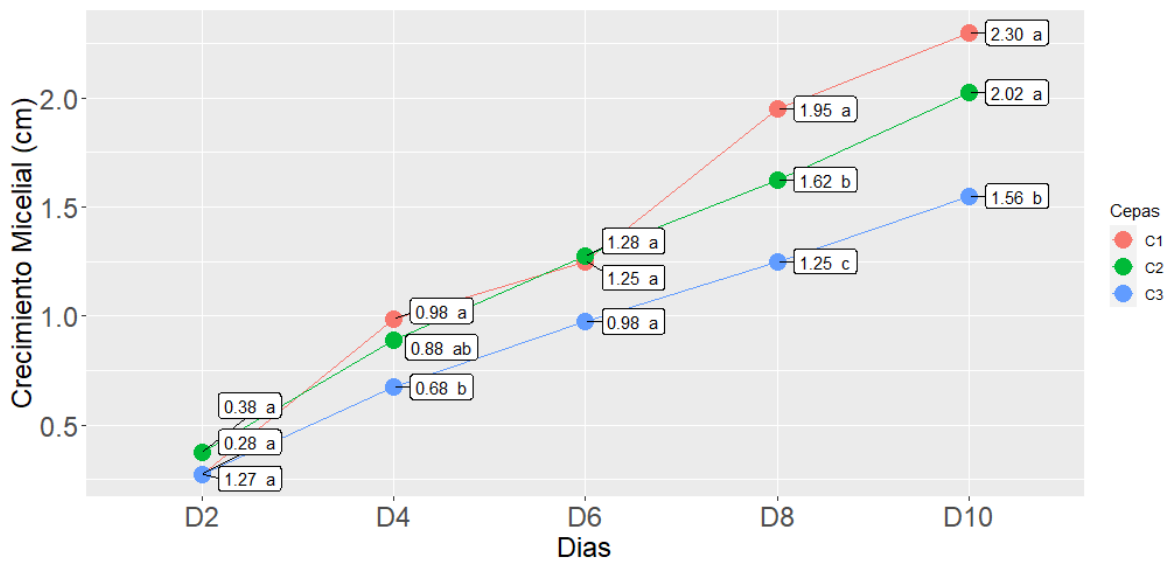
El análisis muestra que la interacción Día*Cepas es significativa $p < 0.001$, por lo que se realizó un anova con la función rmanova y la prueba post-hoc con la función rmmcp para cada Día. Sin embargo, los efectos principales de los días $P < 0.0001$, y Cepas $p < 0.0001$ también son significativos (Anexo 14).

Para el día 1 no se observan diferencias significativas $p > 0.05$, en el crecimiento de las cepas, y se ubican en el rango a. En el día 2 se observan diferencias significativas $p < 0.01$, La cepa 1 ($Mr = 0.9875$) en el rango a y cepa 3 ($Mr = 0.6750$) en el rango b, la cepa 2 ($Mr = 0.8875$) participa del rango a y b. En el día 3 no se observan diferencias significativas $p > 0.05$, las 3 cepas están en el rango a. En el día 4 se observan diferencias altamente significativas $p < 0.001$, cepa 1 ($Mr = 1.95$) en el rango a, cepa 2 ($Mr = 1.625$) en el rango b y cepa 3 ($Mr = 1.25$) en el rango c. En el día 5 se observan diferencias significativas $p < 0.01$, la

cepa 1 (Mr=2.30) y cepa 2 (Mr=2.02) se ubican en el rango a y cepa 3 (Mr=1.55) en el rango b (Figura 2).

Figura 2

Medias recortadas al 20 % del crecimiento del micelio durante 10 días (registradas cada 2 días) por efecto de las cepas y el tiempo



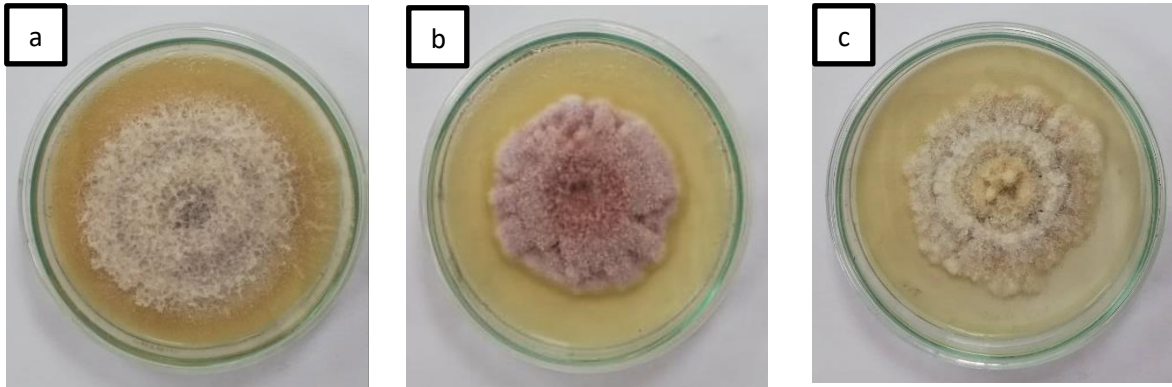
Fuente Autor

5.1.1.2. Aspecto del micelio de las tres cepas de *Fusarium* spp.

El aspecto del micelio aéreo que presentaron las tres cepas de *Fusarium* spp. fueron (Figura 3) de apariencia algodonosa para las cepas 1 y 2 y liso para la cepa 3 que tuvo un crecimiento de micelio aéreo escaso. Todas las cepas presentaron un crecimiento moderadamente lento; esto, de acuerdo a Nelson, Toussoun, y Marasas (1983), con menos de 7 cm de diámetro después de 10 días, llegando a cubrir toda la caja Petri aproximadamente a los 30 días después de la siembra.

Figura 3

Aspecto del micelio aéreo de las tres cepas de Fusarium spp. de 25 días de edad crecidos en medio de cultivo PDA (a) cepa 1 (b) cepa 2 (c) cepa 3



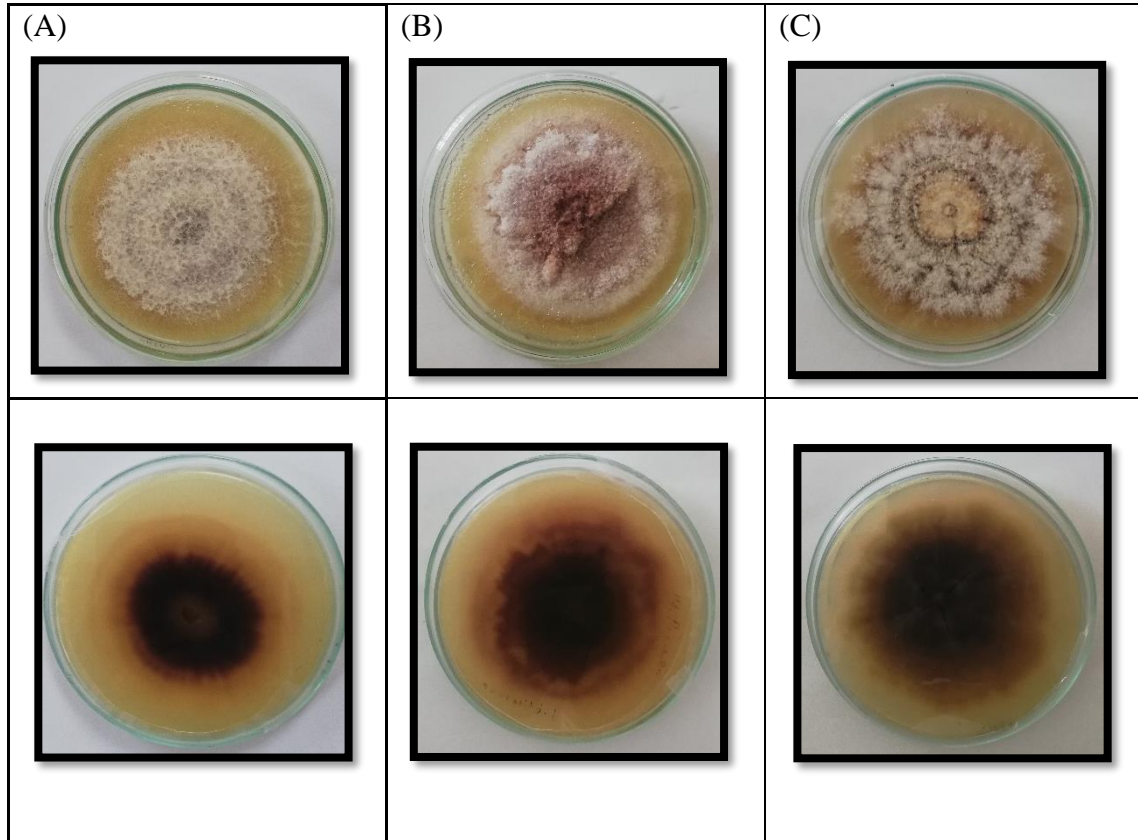
Fuente: Autor

5.1.1.3. Pigmentaciones de las tres cepas de *Fusarium* spp.

En la figura 4 se observan las coloraciones de las tres cepas de *Fusarium* spp obtenidos en placas PDA. En la primera cepa el micelio fue de color RV-196 Rosa Saudade, la pigmentación que presentó al reverso de la caja fue RV-100 Marrón Café. En la segunda cepa se produjo micelio aéreo RV-170 Violeta Persia y la pigmentación al reverso de la caja se mostró RV-101 Marrón Ébano. La tercera cepa presentó micelio aéreo de color RV-9010 Blanco en su fase inicial, posteriormente se tiño de RV-1013 Blanco Hueso, hasta alcanzar completamente este color en toda la caja, la pigmentación que presentó al reverso de la caja fue RV-133 Verde Dharma.

Figura 4

Pigmentación de las cepas de Fusarium spp. de 30 días de edad en medio de cultivo PDA. Imagen superior muestra el anverso (micelio) y la imagen inferior, reverso la pigmentación de cada una de las cepas. (A) cepa 1 (B) cepa 2 y (C) cepa 3



Fuente: Autor

5.1.2. Características microscópicas de las cepas de *Fusarium* spp.

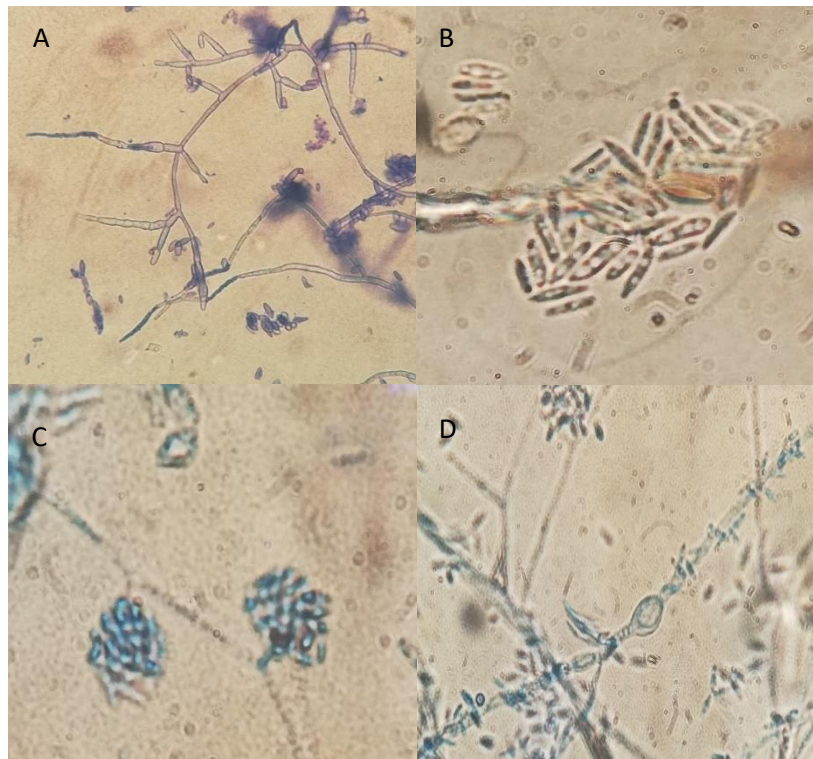
La caracterización microscópica se llevó a cabo en cultivos crecidos en medio de cultivo CLA. Se basó en la morfología de las células conidiógenas, presencia y ausencia de microconidios, morfología de macroconidios y presencia y ausencia de clamidosporas.

5.1.2.1. Características de la cepa 1 (M3) en medio CLA.

En la primera cepa en medio de cultivo CLA, las células conidiógenas fueron monofiálides ramificados y no ramificados. Se presentaron macroconidios de forma recta a levemente curvada con 3 a 5 septos, célula apical y basal son ligeramente curvada y afilada. Los microconidios tienden a ser ovalados, en masas, sin septos y escasos. Se observó la producción de clamidosporas intercalares, solitarias, globosas, formadas en las hifas (Figura 5).

Figura 5

Cepa 1(M3). A) Monofialides ramificados y no ramificados B) Macroconidios. C) Microconidios a los 30 DDS. D) Clamidosporas intercalares en medio CLA



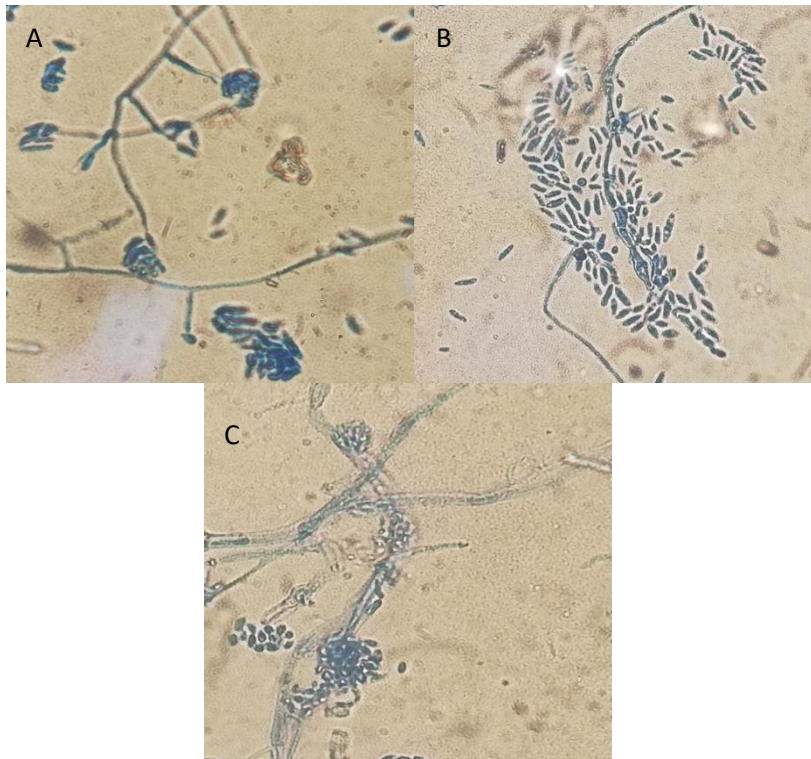
Fuente: Autor

5.1.2.2. Características de la cepa 2 (059) en medio CLA.

Las células conidiógenas predominantes para esta cepa son las monofialides simples y cortas. En medio de cultivo CLA los macroconidios son septados (3 septos), abundantes y relativamente rectos, célula apical y célula basal redondeada, los microconidios tienden a ser ovalados, formados en el micelio aéreo, no presentaron septos. No se observó la producción de clamidosporas (Figura 6).

Figura 6

Cepa 2 (059B). A) Monofialides simples B) Macroconidios. C) Microconidios a los 30 DDS



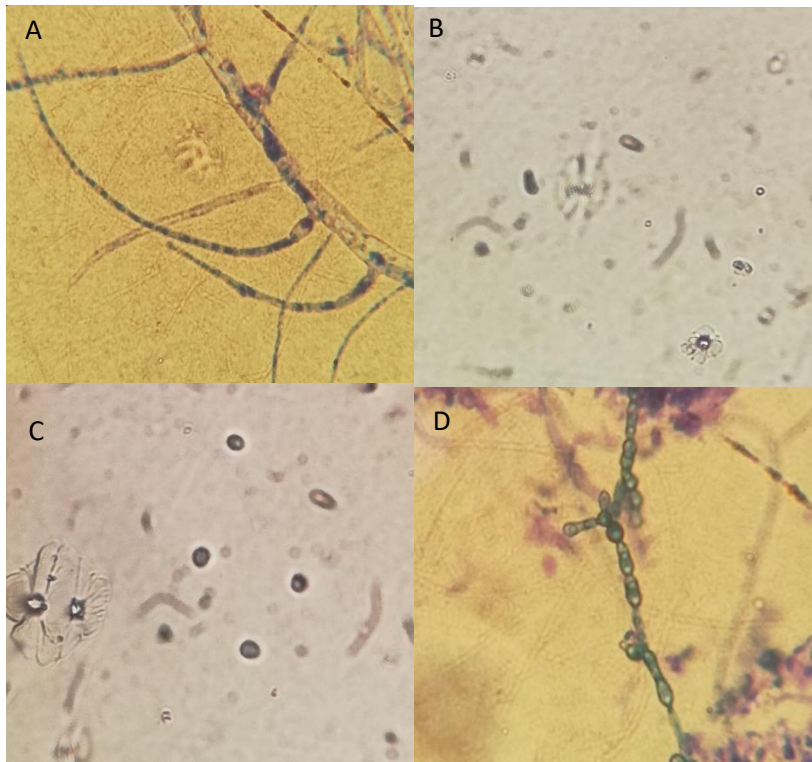
Fuente: Autor

5.1.2.3. Características de la cepa 3 (04) en medio CLA.

Las células conidiógenas predominantes fueron monofialides simples y largas. Presentó macroconidios los cuales fueron rectos, septados con 2 a 3 septos, célula apical y célula basal redondeados. Los microconidios tienden a ser ovalados sin septos. Se observaron clamidosporas intercalares en cadenas formadas a partir de hifas (Figura 7).

Figura 7

Cepa 3 (04). A) Monofialides simples B) Macroconidios. C) Microconidios a los 30 DDS. D) Clamidosporas intercalares en cadenas en medio CLA



Fuente: Autor

5.2. Identificación molecular

5.2.1. PCR para *F. graminearum*

La identificación de la especie *F. graminearum* se llevó a cabo mediante el empleo de 5 pares de primers: gaoA1F/gaoA1R; gaoA2F/gaoA2R; gaoA3F/gaoA3R; gaoA4F/gaoA1R y gaoA5F/gaoA2R, que detectan y amplifican un fragmento de 435 pb de la región codificadora 3' del gen gaoA que codifica la enzima galactosa oxidasa (GO) (Biazio y col., 2008). La lista de secuencias de primers utilizados se muestran en la (Tabla 3). Este tipo de PCR se aplicó a las tres cepas de *Fusarium* spp., crecidos en medio PDA empleadas en este trabajo de investigación, proporcionadas por el Departamento de Protección Vegetal de la Estación Experimental del Austro, Gualaceo, Sector Bullcay del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). Las amplificaciones realizadas no permitieron observar la banda específica esperada de 435 pb, correspondientes a cepas de *F. graminearum*. Dando como resultado que las tres cepas analizadas en este trabajo no corresponden a *Fusarium graminearum*.

5.3. Evaluación de la incidencia y severidad de *Fusarium* spp. en seis variedades de trigo

5.3.1. Incidencia de las tres cepas de *Fusarium* spp. en las seis variedades de trigo

La incidencia de las tres cepas de *Fusarium* spp. inoculadas en las seis variedades de trigo, se analizó mediante el uso de modelos mixtos. Al comparar los modelos con varianzas heterogéneas (2) y homogéneas (1) mediante una prueba de razón de verosimilitud, se confirmó que el modelo 2 con varianzas heterogéneas es el que presentó un mejor ajuste ($p < 0.05$), como se muestra en la (Tabla 6).

Tabla 6

Comparación de modelos con varianzas heterogéneas (2) y homogéneas (1) mediante una prueba de razón de verosimilitud

	Model	Df	AIC	BIC	logLik	Test	L.Ratio	p-value
modelo_1_Incidencia_R.	1	17	584.18	619.78	-275.09			
modelo_2_Incidencia_R.	2	21	581.16	625.14	-269.58	1 vs 2	11.02	0.0264

Fuente: Autor

Analizando el cuadro de la prueba de hipótesis marginal, se observa que la interacción de factores fijos (variedad*cepas) es altamente significativa $F(8, 56) = 6.73$, $p < 0.01$, al igual que los efectos individuales como variedad $F(4, 56) = 18.33$, $p < 0.01$, y cepa $F(2, 56) = 19.95$, $p < 0.01$ (Anexo 15).

Para el análisis funcional se usó el método de comparación múltiple basado en la prueba de formación de grupos excluyentes (DGC ($\alpha = 0.05$)) con la corrección de Bonferroni (Di Rienzo et al. 2002), con la finalidad de reducir la excesiva sobreposición de rangos.

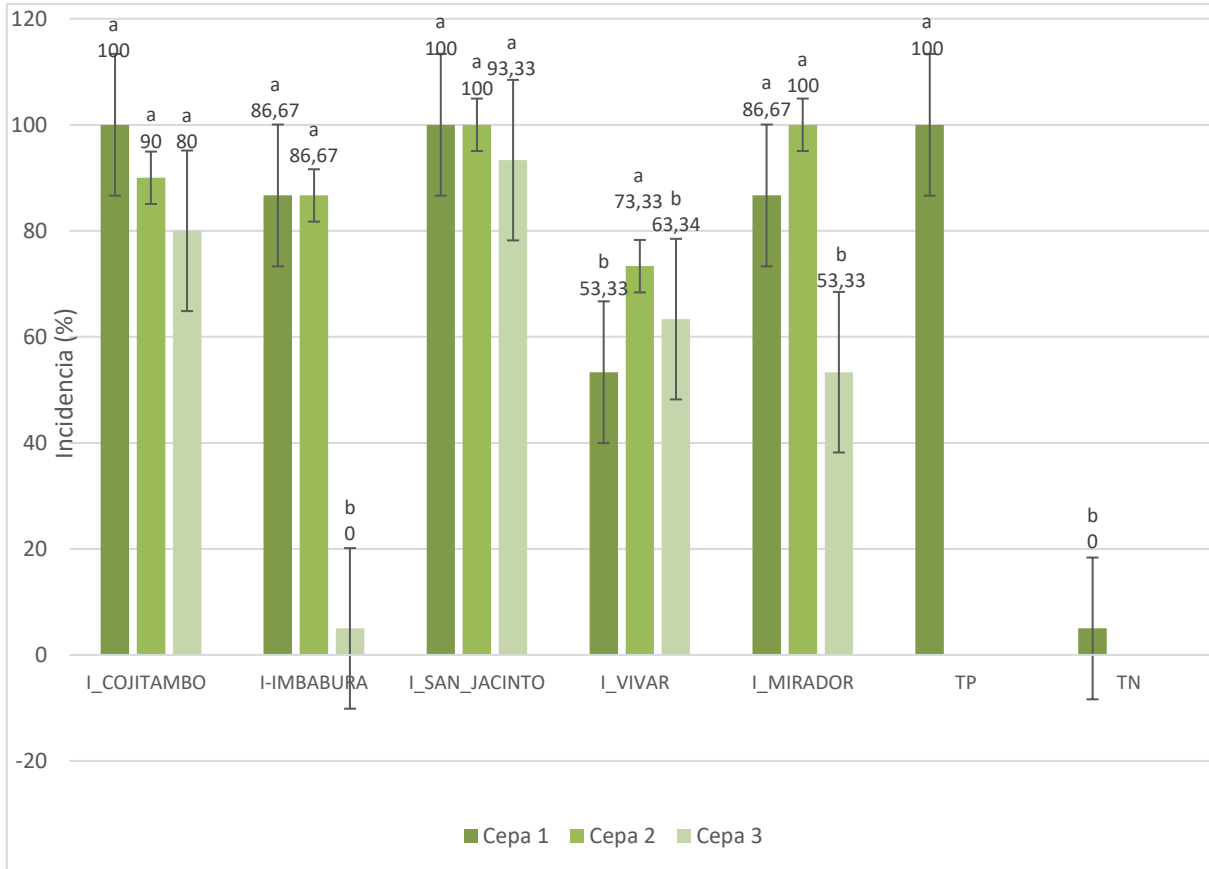
La variedad Iniap Cojitambo 92 (Media=90.00, DE=21.64) reacciona en forma similar en las 3 cepas; cepa 1 (Media=100, DE=0.00), cepa 2 (Media=90.00, DE=22.36) y cepa 3 (Media=80.00, DE=29.82), todas en el rango a. La variedad Iniap San Jacinto 2010 (Media=97.78, DE=8.61) también reacciona en forma similar en las 3 cepas; cepa 1 (Media=100, DE=0.00), cepa 2 (Media=100, DE=0.00) y cepa 3 (Media=93.33, DE=14.91) en el rango a.

La variedad Iniap Imbabura 2014 (Media=57.78, DE=46.23) reacciona en forma similar a las cepas 1 (Media=86.67, DE=29.82) y 2 (Media=86.67, DE=18.26) en el rango a, y muestra el valor más bajo para la cepa 3 (Media=0.00, DE=0.00) en el rango b. La variedad Iniap Vivar 2010 (Media=63.33, DE=22.89) con la cepa 2 (Media=73.33, DE=27.89) pertenece al rango a y las cepas 1 (Media=53.33, DE=27.39) y cepa 3 (Media=63.34, DE=7.46) pertenecen al rango b. La variedad Iniap Mirador 2010 (Media=80.00, DE=27.60) reacciona en forma asimilar a las cepas 1 (Media=86.67, DE=18.26) y cepa 2 (Media=100, DE=0.00) en el rango a. La cepa 3 (Media=53.33, DE=29.82) en el rango b.

En la comparación de los factores vs. testigos, los factores (Media=77.78, DE=31.40) están en el rango a y los testigos (Media=50.00, DE=52.7) en el rango b. Comparando los testigos, el testigo positivo Iniap Chimborazo (TP), inoculado con las tres cepas de *Fusarium* spp., presenta una incidencia de 100% (Media=100, DE=0.00) está en el rango a, y el testigo negativo Iniap Chimborazo (TN) inoculado con agua destilada, no presenta incidencia (Media=0.00, DE=0.00) se encuentra en el rango b (Figura 8).

Figura 8

Efecto de las 3 cepas en cada variedad en la expresión de la incidencia. Promedio de los factores vs. Testigos y promedio del testigo positivo y testigo negativo



Fuente: Autor

5.3.2. Severidad de las tres cepas de *Fusarium* spp. en seis variedades de trigo

5.3.2.1. Severidad de la cepa 1 de *Fusarium* spp. en seis variedades de trigo.

La respuesta de las 6 variedades de trigo inoculadas con la cepa 1 a los 12, 17 y 21 días post inoculación se observa en la tabla 21, donde el nivel de severidad va desde 4,25% hasta 5,57%. Las variedades INIAP-VIVAR 2010 (5,11%) y INIAP-MIRADOR 2010 (5,57%) se comportaron de manera similar a lo esperado, presentando una reacción de resistente. INIAP-COJITAMBO 92 (4,25%), INIAP-IMBABURA 2014 (4,84%) e INIAP-SAN JACINTO 2010 (5,35%) tuvieron un comportamiento diferente a lo esperado, presentando las tres variedades una reacción de susceptible (Tabla 7).

Tabla 7

*Reacción de las variedades de trigo inoculadas con la cepa 1 (*Fusarium* spp.) mediante el índice de severidad*

Variedades	Severidad (%)	Escala	Reacción esperada	Reacción encontrada
INIAP-COJITAMBO 92	4,25	1	Susceptible	Resistente
INIAP-IMBABURA 2014	4,84	1	Resistencia parcial	Resistente
INIAP-SAN JACINTO 2010	5,35	1	Resistencia parcial	Resistente
INIAP-VIVAR 2010	5,11	1	Resistente	Resistente
INIAP-MIRADOR 2010	5,57	1	Resistente	Resistente
Testigo sensible inoculado	5,67	1	Susceptible	Resistente
Testigo sensible sin inoculación	0,00	0	Susceptible	Inmune

Fuente: Autor

5.3.2.2. Severidad de la cepa 2 (*Fusarium spp.*).

Las variedades de trigo INIAP-VIVAR 2010 (5,28%) y INIAP-MIRADOR 2010 (4,90%) se comportaron de manera similar a lo esperado, catalogándose como resistentes. Así también las variedades INIAP-COJITAMBO 92 (4,53%), INIAP-IMBABURA 2014 (4,46%) e INIAP-SAN JACINTO 2010 (4,86%), presentaron valores de reacción diferentes a lo esperado, comportándose todos como resistentes (Tabla 8).

Tabla 8

*Reacción de las variedades de trigo inoculadas con cepa 2 (*Fusarium spp.*) mediante el índice de severidad*

Variedades	Severidad (%)	Escala	Reacción esperada	Reacción encontrada
INIAP-COJITAMBO 92	4,53	1	Susceptible	Resistente
INIAP-IMBABURA 2014	4,46	1	Resistencia parcial	Resistente
INIAP-SAN JACINTO 2010	4,86	1	Resistencia parcial	Resistente
INIAP-VIVAR 2010	5,28	1	Resistente	Resistente
INIAP-MIRADOR 2010	4,90	1	Resistente	Resistente
Testigo sensible inoculado	5.67	0	Susceptible	Resistente
Testigo sensible sin inoculación	0.00	0	Susceptible	Inmune

Fuente: Autor

5.3.2.3. Severidad de la cepa 3 (*Fusarium spp.*).

La severidad de la cepa 3 osciló entre un mínimo de 0.00 % a un máximo de 4,92%. Las variedades INIAP-VIVAR 2010 (3,84%) y INIAP-MIRADOR 2010 (3,92%) tuvieron un comportamiento igual a lo esperado, presentando una reacción de resistente. Por otro lado, las variedades INIAP-COJITAMBO 92 (4,47%), INIAP-IMBABURA 2014 (1,05%) e INIAP-SAN JACINTO 2010 (4,92%) se comportaron de

manera muy diferente a lo esperado, presentado estas tres variedades una reacción de resistente como se observa en la (Tabla 9).

Tabla 9

*Reacción de las variedades de trigo inoculadas con la cepa 3 (*Fusarium* spp.) mediante el índice de severidad*

Variedades	Severidad (%)	Escala	Reacción esperada	Reacción encontrada
INIAP-COJITAMBO 92	4,47	1	Susceptible	Resistente
INIAP-IMBABURA 2014	0,00	1	Resistencia parcial	Resistente
INIAP-SAN JACINTO 2010	4,92	1	Resistencia parcial	Resistente
INIAP-VIVAR 2010	3,84	1	Resistente	Resistente
INIAP-MIRADOR 2010	3,92	1	Resistente	Resistente
Testigo sensible inoculado	5.67	0	Susceptible	Inmune
Testigo sensible sin inoculación	0.00	0	Susceptible	Inmune

Fuente: Autor

5.3.2.4. Severidad de las tres cepas de *Fusarium* spp. para las seis variedades de trigo.

La variable severidad se analizó bajo el diseño completamente al azar balanceado con el paquete “ExpDes y la función fat2.ad2.crd.” de R. La prueba de Shapiro-Wilk al 5% de significación, con $p\text{-value} = 0.1696129$, considera a la variable severidad como normal. El paquete ExpDes aun no desarrolla la prueba de homogeneidad de varianzas (Ferreira et al., 2014), sin embargo, se analizó como tratamientos (17) con la prueba de Levene obteniendo un valor de $p > 0.05$, indicando que los grupos presentan varianzas homogéneas (Anexo 18).

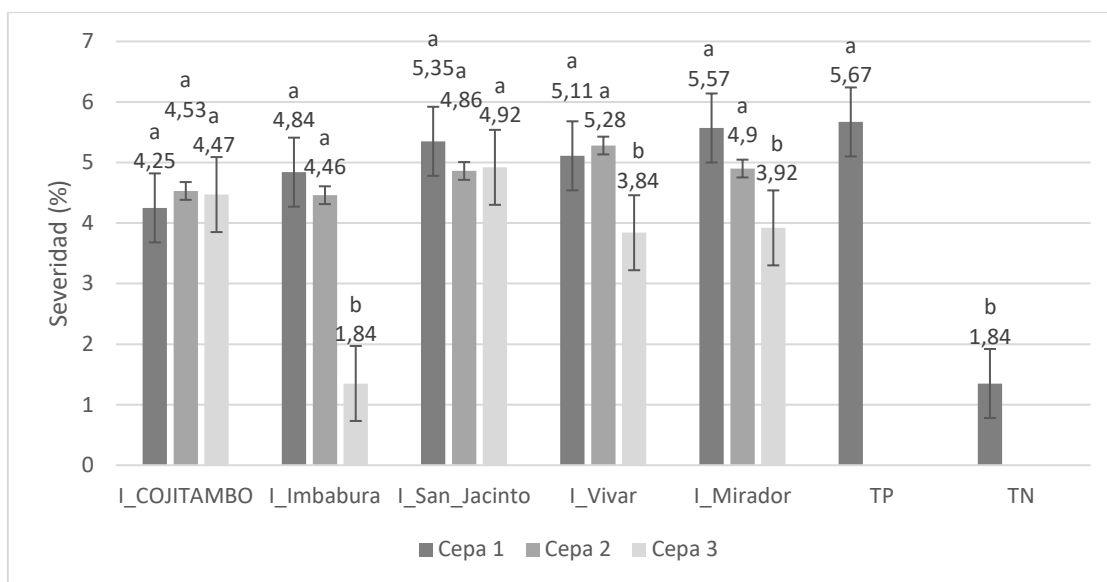
El adeva muestra que la interacción del factor variedades por el factor cepas es significativa $F(8, 68) = 6.72, p < 0.05$, por lo que se analizó el comportamiento de las 3 cepas en cada variedad. Sin embargo, los efectos simples de los factores variedades $F(4, 68) = 11.03, p < 0.05$ y cepas $F(2, 68) = 29.60, p < 0.05$ presentan significación estadística. La comparación de los factores con los testigos adicionales es significativa $F(1, 68) = 15.20, p < 0.05$. La comparación del testigo positivo con el testigo negativo es significativo $F(1, 68) = 101.78, p < 0.05$ (Anexo 19).

Para el análisis funcional se usó la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$). La variedad Iniap Cojitambo 92 (Media=4.42, DE=0.61) reacciona de forma similar en las 3 cepas: Cepa 1 (Media=4.25, DE=0.69), Cepa 2 (Media=4.53, DE=0.54) y Cepa 3 (Media=4.47, DE=0.69), todas en el rango a. La variedad Iniap San Jacinto 2010 (Media=5.04, DE=0.55) también reacciona en forma similar en las 3 cepas; Cepa 1 (Media=5.35, DE=0.59), Cepa 2 (Media=4.86, DE=0.52) y Cepa 3 (Media=4.92, DE=0.51) en el rango a. La variedad Iniap Imbabura 2014 (Media=3.71, DE=1.49) reacciona en forma similar a las cepas 1 (Media=4.84, DE=0.73) y 2 (Media=4.46, DE=0.72) en el rango a, y muestra el valor más bajo para la cepa 3 (Media=1.84, DE=0) en el rango b, el mismo valor que el testigo inoculado con agua destilada (TN) (Media=1.84, DE=0.00), en el rango b. El testigo positivo inoculado (TP) Iniap Chimborazo presenta el valor más elevado de severidad (Media=5.67, DE=0.65), en el rango a y el testigo negativo (TN) inoculado con agua destilada presenta el valor más bajo (Media=1.84, DE=0.00) en el rango b. La variedad Iniap Vivar 2010 (Media=4.74 DE= 0.91) reacciona de manera similar en las cepas 1 (Media=5.11, DE=0.75), y 2 (Media=5.28, DE=0.61) en el rango a, y presenta el valor más bajo para la cepa 3 (Media=3.84, DE=0.64) en el rango b. La variedad Iniap Mirador 2010 (Media=4.80,

DE=0.91) reacciona en forma asimilar a las cepas 1 (Media=5.57, DE=0.63) y 2 (Media=4.9, DE=0.54) en el rango a. La cepa 3 (Media=3.92, DE=0.7) en el rango b (Figura 9).

Figura 9

Efecto de las 3 cepas de Fusarium spp., en combinación con las 5 variedades de trigo sobre los síntomas de severidad representados por los diagramas de cajas con los p-valores, más la comparación entre testigos



Fuente: Autor

Después de las evaluaciones, cuando las espigas alcanzaron la madurez se cosechó y trillo manualmente el grano de cada variedad separados por tratamientos, los granos enfermos se diferenciaron visualmente de los sanos debido a que son de menor tamaño, chuzos y de maduración incompleta. Las espigas infectadas por las tres cepas de *Fusarium* spp. de cada una de las seis variedades de trigo evaluadas, a los 21 días post inoculación, presentaron los síntomas típicos de fusariosis de la espiga de trigo.

6. DISCUSIÓN

De acuerdo a las características culturales y morfológicas, las tres cepas fueron identificados dentro del genero *Fusarium* pero no se pudo confirmar a que especie pertenecian. A partir de la observación microscópica se establecieron las características morfológicas de los conidios y de otras estructuras (forma, número de septos, presencia o ausencia de clamidosporas), así como las características culturales (forma, pigmentación, tasa de crecimiento o tipo de micelio) que permitieron efectuar una descripción de las mismas.

Al analizar los criterios morfológicos y culturales para la identificación de las especies, se observó que la densidad del micelio y la pigmentación variaron según las distintas cepas, presentando una coloración rosada para la cepa 1, violeta para la cepa 2 y blanco hueso para la cepa 3. Al respecto Pitt & Hocking (2009), manifiestan que la identificación a nivel de género generalmente se puede hacer a partir de la apariencia de la colonia, el medio PDA permite observar la morfología de la colonia y pigmento (café, blanco, rojo, naranja, rosa o morado, de pálido a rojo o violeta al revés) son indicativas del género *Fusarium*.

Con respecto a las características microscópicas, todas las cepas presentaron las características propias de *Fusarium* spp. Las células conidiógenas predominantes fueron monofialides simples, cortas y largas, ramificadas para la cepa 1. Los macroconidios septados (3 a 5 septos), la forma recta fue predominante (cepa 2 y 3), y levemente curvada (cepa 1), la célula apical y célula basal redondeados para la cepa 2 y 3, célula apical y basal son ligeramente curvada y afilada (cepa 1). Los microconidios fueron ovalados en todas las cepas, en masas, y sin septos. Se observaron clamidosporas intercalares y en cadenas formadas a

partir de hifas en medio CLA. Estas descripciones concuerdan con lo reportado por Leslie y Summerell, (2006) y Nelson, Toussoun, y Marasas (1983), quienes mencionan que las principales características morfológicas para la identificación del género *Fusarium* son las siguientes: las células conidiógenas que dan lugar a macroconidios o las microconidias son monofialidas o una mezcla de monofialidas y polifialidas.

Los macroconidios presentan tres formas básicas: macroconidios rectos, que puede parecer casi como una aguja, macroconidias con curvatura dorsiventral y macroconidios en los que el lado dorsal (superior) es claramente más curvado que el lado ventral (inferior). Generalmente tienen al menos tres septos, con una célula apical diferenciada que puede ser puntiaguda, redondeado, en forma de gancho o filamentosos, y una célula basal que puede tener forma de pie, con un talón distinto, o solo ligeramente muescas. Los microconidios poseen variadas formas (ovalada, obovoide, piriforme, napiforme, globoso y fusiforme) El número de septos suele ser 0 o 1. De igual forma, pueden observarse las clamidosporas características con doble pared gruesa, lisa o rugosa; pueden formarse individualmente, doblemente, en grupos y en cadenas.

En cuanto a la reacción para la resistencia, las variedades de trigo INIAP-COJITAMBO 92, INIAP-IMBABURA 2014 e INIAP-SAN JACINTO 2010 se comportaron de manera muy diferente a lo esperado, presentado estas tres variedades una reacción de (resistencia) en la escala propuesta por el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT, 1994), es decir todas las variedades de trigo evaluadas en la presente investigación presentaron una reacción de (resistencia) ante la inoculación de las tres cepas de *Fusarium*, Este resultado podía estar relacionado por la influencia de las condiciones ambientales, a la falta de uniformidad en el cultivo, debido a que las espigas no son

homogéneas, existiendo variabilidad de la antesis, también pudo verse influenciado por la variabilidad de la humedad, la posible existencia de genes de resistencia presentes en las diferentes variedades evaluadas. Esto coincide con Ireta y Gilchrist (1994) quienes mencionan que la identificación de materiales resistentes se dificulta incluso por pequeñas diferencias en el ciclo vegetativo de los genotipos determinando diferencias en la infección. También es posible que el manejo experimental que se siguió en esta investigación haya favorecido a los cultivos y no al desarrollo del patógeno. De igual manera Nisi, (2003) demuestra que además de la complejidad genética de la resistencia y el proceso de infección, la variabilidad causada por diferentes prácticas de manejo y condiciones climáticas es muy importante. También fue evidente que a pesar de que las tres cepas de *Fusarium* spp evaluados son de origen distinto, al evaluar la severidad de los daños, todos mostraron el mismo grado de afección, cuando se desarrollaron en iguales condiciones ambientales, demostrando una baja agresividad o virulencia. Se ha evidenciado que oomicetes como *Phytophthora infestans* pierden agresividad como patógenos al pasar por diferentes etapas de cultivo in vitro (comunicación personal). Lo mismo podría ocurrir con las cepas de *Fusarium* que en este caso han sido repicadas varias veces.

También pudo deberse a que los cultivares presentaron una resistencia a la penetración del hongo como lo señala con Ireta y Gilchrist (1994) quienes describieron tres tipos de resistencia genética a la fusariosis del trigo, en la cual la Resistencia Tipo II o de invasión hace referencia a que el patógeno logra penetrar en el hospedero, pero las hifas del hongo no pueden invadir las células adyacentes al punto de penetración.

La evaluación de la variable incidencia registró valores comprendidos entre 0 y 100 % para los diferentes tratamientos y valores de severidad de nivel 2 (0 y 5,67%) según la escala propuesta por el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT, 1994). En concordancia Bobadilla Meléndez et al., (2019) reportaron valores de incidencia de 25 a 100% y de severidad entre 1 y 12%, en cultivares de cebada utilizando el método de inoculación puntual en invernadero, en donde en la mayoría de las espigas la necrosis se desarrolló en la espiguilla en donde se depositó el inóculo. Por otro lado Ortega, (2002), reporta valores de severidad entre 7,14 y 76% en cultivares de trigo, utilizando método de inoculación por algodón.

7. CONCLUSIONES

De la presente investigación realizada se puede concluir lo siguiente:

- En el presente trabajo se caracterizó morfológicamente tres cepas de *Fusarium* spp. aisladas de trigo de diferentes zonas trigueras.
- En el presente estudio de acuerdo al análisis de las variables, todas las variedades de trigo presentaron una calificación de (Resistente) en la escala propuesta por el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo, para la evaluación de severidad en las espigas de trigo.
- Las tres cepas de *Fusarium* spp. utilizados en el test de patogenicidad fueron capaces de infectar todos los cultivares de trigo e indujeron los síntomas característicos de la FET sobre espigas de trigo inoculadas mediante inoculación puntual bajo condiciones de invernadero. Las cepas tuvieron el mismo nivel de patogenicidad, presentando diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la medición de las variables incidencia y severidad.

8. RECOMENDACIONES

- En vista de que al evaluar la agresividad de las tres cepas de *Fusarium* spp., limitado únicamente a un ciclo de cultivo, permite observar niveles diferentes de respuesta en función de los cultivares de trigo utilizados, pero no en la agresividad de las diferentes cepas. Se recomienda realizar pruebas de patogenicidad por cultivar, por año, en un tiempo y ambiente determinado, con el fin de evaluar diferencias en los niveles de infección de las distintas cepas de *Fusarium* spp.
- La identificación molecular se realizó únicamente con primers específicos para *F. graminearum*, por lo tanto sería recomendable continuar con estos estudios para poder afirmar de manera concreta que especie de *Fusarium* spp., es el causante de la enfermedad, ya que existen PCR desarrolladas para otras especies de *Fusarium* spp.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarado, A. (2010). Caracterización enzimática y molecular de cepas de *Fusarium* spp. Aisladas de humanos, animales y plantas: aproximación al modelo multihospedero. Tesis Microbiología Industrial, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá. 52 p.
- Biazio, G. R., Guimarães Sousa, G., Tessmann, D. J., y Parra Barbosa-Tessmann, I. (2008). A new PCR approach for the identification of *Fusarium graminearum*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(3), 554–560.
- Bobadilla Meléndez, M., Hernández-Anguiano, A. M., Zamora Díaz, M. R., & Vargas Hernández, M. (2019). Evaluación de líneas de cebada maltera a fusariosis de la espiga y acumulación de deoxinivalenol. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(3), 485–498. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i3.916>
- Caro, N. (2015). Caracterización de especies de *Fusarium* aisladas de trigo nacional respecto a su capacidad micotoxigénica. Universidad de Concepción Facultad de Farmacia – Programa de Magíster en Ciencias Farmacéuticas.
- Di Rienzo, J. A. ; Macchiavelli, R.E ; Casanoves, F. 2017. Linear mixed models : applications in InfoStat . 1a edición especial. Libro digital, PDF Archivo Digital: descarga ISBN 978-987-42-4986-9 1.
- Ernst, C. (2007). Fusariosis de la espiga en trigo : características de la enfermedad y posibilidades de uso de modelos de predicción para optimizar el control químico *Fusarium head blight in wheat : characteristics of the disease and possibilities of using predictive mode*. XI, 11–21.

- Falconi, E. (2008). Plan de recuperación y fomento del cultivo de trigo en Ecuador, mediante el desarrollo y producción de semilla con énfasis en difusión de variedades mejoradas, transferencia de tecnología y capacitación. Quito-Ecuador.
- Feng, C., Liu, H., y Tang, Z. (2018). Fusarium graminearum Inoculation on Wheat Head. *Bio-Protocol*, 8(15), 1–8. <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.2964>
- Ferreira, E. B., Cavalcanti, P. P., & Nogueira, D. A. (2014). ExpDes: An R Package for ANOVA and Experimental Designs. *Applied Mathematics*, 05(19), 2952–2958. <https://doi.org/10.4236/am.2014.519280>
- Gilchrist, L., Fuentes, C., Martinez, R., Lopez, E., Duveiller, P., Singh, M., y Garcia, A. (2005). Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada (CIMMYT, ed.). Mexico.
- Gerlach, W., & Nirenberg, H. (1982). *The genus Fusarium: A pictorial atlas*. Berlín-Dahlem: Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft.
- Guarro, J., Pujol, I., y Mayayo, E. (1999). In vitro and in vivo experimental activities of antifungal agents against Fusarium solani. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(5), 1256–1257. <https://doi.org/10.1128/aac.43.5.1256>
- Hoaglin, D. C., & Iglewicz, B. (1987). Fine-tuning some resistant rules for outlier labeling. *Journal of the American Statistical Association*, 82(400), 1147–1149. <https://doi.org/10.1080/01621459.1987.10478551>
- Hyndman, R. J. (2010). *Transforming data with zeros*. Hyndsight. <https://robjhyndman.com/hyndsight/transformations/>

INEC. (2018). *Indice de publicaciones SPAC*. Quito: Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua ESPAC.

INIAP. (2011). *Guía del Cultivo del Trigo*. Obtenido de <http://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/381/4/iniapscbd411.pdf>

Ireta, M., y Gilchrist, L. (1994). Roña O Tizon De La Espiga Del Trigo. *Informe especial de trigo*. México, D.F: CIMMYT.

J. A. Di Rienzo, J.A.; Guzmán, A. W. y Casanoves, F. 2002. A Multiple-Comparisons Method Based on the Distribution of the Root Node Distance of a Binary Tree. *Journal of Agricultural, Biological, and Environmental Statistics*, Vol. 7, No. 2 (Jun., 2002), pp. 129-142 Published by: International Biometric Society Stable URL: <http://www.jstor.org/stable/1400690> Accessed: 17-07-2015 20:35 UTC

John I, P., & Ailsa D, H. (2009). Fungi and Food Spoilage. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (3rd ed, Vol. 53, Issue 9).

Leslie, J. F., & Summerell, B. A. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual*. (1st edition). Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA. 388p.

Lorenzo, P. A. (2018). *Identificación de especies de Fusarium causantes de la roña del trigo (Triticum aestivum) en los valles altos de México*. (June), 0–57. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.14596.42889>

Lofgren, L. A., LeBlanc, N. R., Certano, A. K., Nachtigall, J., LaBine, K. M., Riddle, J., ... Kistler, H. C. (2018). *Fusarium graminearum*: pathogen or endophyte of North American grasses? *New Phytologist*, 217(3), 1203–1212.

Malaissi, T. (2016). “*Fusariosis de la espiga de trigo: las malezas como fuente de inóculo.*”

[Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata Trabajo.

http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/53253/Documento_completo.pdf?sequence=3

Mendes, G., Del Ponte, E., Feltrin, A. C., Badiale-Furlong, E., y de Oliveira, A. C. (2018).

Common resistance to fusarium head blight in Brazilian wheat cultivars. *Scientia Agricola*, 75(5), 426–431.

Mourellos, C. A. (2015). *Fusosis de la espiga de trigo: Dinámica del inóculo de Fusarium*

graminearum ante un manejo sustentable. 170.

Moreno, I., Ramírez, A., Plana, R., & Iglesias, I. (2001). El cultivo de trigo. Algunos

resultados de su producción en Cuba. *Cultivos Tropicales*, 22(4), 55–67.

<https://www.redalyc.org/html/1932/193230162009/>

Naeini, A., Ziglari, T., Shokri, H., y Khosravi, A. R. (2010). Assessment of growth-inhibiting

effect of some plant essential oils on different Fusarium isolates. *Journal de Mycologie Medicale*, 20(3), 174–178.

Nelson, P. E., Toussoun, T. A., y Marasas, W. F. O. (1983). *Fusarium Species: An Illustrated*

Manual for Identification. In *Pennsylvania State University Press: University Park, PA.*

Nelson, P. E., Dignani, M. C., & Anaissie, E. J. (1994). Taxonomy, biology, and clinical

aspects of Fusarium species. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 7, Issue 4).

<https://doi.org/10.1128/CMR.7.4.479>

Nicholson, P., Simpson, D.R., Weston, G., Rezanoor, H.N., Lees, A.K., Parry, D.W., and Joyce, D. (1998). Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assays. *X-Ray Microanalysis in Biology*, 1–2. <https://doi.org/10.1017/cbo9780511600371.002>

Nicholson, P., Gosman, N., Draeger, R., Thomsett, M., Chandler, E., y Steed, A. (2007). The *Fusarium* Head Blight Pathosystem. *Wheat Production in Stressed Environments*, (Windels 2000), 23–36. https://doi.org/10.1007/1-4020-5497-1_3

Nisi, J. (2003). “*Desarrollo de tecnologías para el manejo integrado de la Fusariosis de la Espiga de Trigo*”. Programa Cooperativo para el Desarrollo Tecnológico Agroalimentario y Agroindustrial del Cono Sur. IICA (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura).

Ortega, L. M. (2017). Caracterización de aislamientos de *Fusarium graminearum* y su relación con el deterioro de granos de trigo infectados. Universidad Nacional de la Plata Facultad de Ciencias Exactas.

Ortega, S. (2002). *Especies de Fusarium Causantes de la Roña de la Espiga de Trigo (Triticum aestivum L) en Cinco Localidades de México* [UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO DIVISION DE AGRONOMÍA]. <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/3739/T13145>

ORTEGA

HERNANDEZ%2C

SATURNINO

TESIS.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Pereyra, S. A., Dill-Macky, R., y Sims, A. L. (2004). Survival and inoculum production of *Gibberella zeae* in wheat residue. *Plant Disease*, 88(7), 724–730.

Pereyra, S., y Acosta, Y. (2014). *Guía para el manejo de la fusariosis de la espiga en trigo*. Retrieved from [http://www.inia.uy/Documentos/INIA La Estanzuela/INIA_guia manejo FE trigo 2014_web \(1\).pdf](http://www.inia.uy/Documentos/INIA_La_Estanzuela/INIA_guia_manejo_FE_trigo_2014_web_(1).pdf)

Pritsch, C., Muehlbauer, G. J., Bushnell, W. R., Somers, D. A., & Vance, C. P. (2000). Fungal development and induction of defense response genes during early infection of wheat spikes by *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13(2), 159–169. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2000.13.2.159>

Reyes, M. E. C., Delgado, C. A. R., y García, C. B. (2010). Comportamiento De Genotipos De Trigo a La Fusariosis De La Espiga En El Departamento De Nariño, Colombia. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 63-1(2248–7026), 5239–5251. Retrieved from <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/refame/article/view/24944/36979>

Ulloa, M., Hanlin, R. T., y Lo Herrera-Suárez, T. (2006). *Nuevo diccionario ilustrado de micología*. 497–498.

Villa-Martínez, A., Pérez-Leal, R., Morales-Morales, H. A., Ba-Surto-Sotelo, M., Soto-Parra, J. M., y Martínez-Escudero, E. (2014). Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta Agronomica*, 64(2). <https://doi.org/10.15446/acag.v64n2.43358>

Villareal, M. (2000). *Efectos de la producción del Trigo (*Triticum aestivum* L) en el Mundo, México y en la Región 5 Manantiales*. Universidad Autónoma Agraria“Antonio

Narroˆ Divisi3n de agronomıa.

Wegulo, S. N., Bockus, W. W., Hernandez Nopsa, J. F., S. Peiris, K. H., & E., F. (2013).

Integration of Fungicide Application and Cultivar Resistance to Manage Fusarium Head Blight in Wheat. In *Fungicides - Showcases of Integrated Plant Disease Management from Around the World* (Issue 2003). <https://doi.org/10.5772/53096>

10. ANEXOS

Anexo 1. *Medio de cultivo Papa-dextrosa-agar (PDA). Fórmula en gramos por litro de agua destilada de agar de dextrosa y papa.*

Ingredientes	g/L
Dextrosa	20.0
Agar	15.0
Infusión de papa	4.0

Fuente: Autor

Este medio es el más utilizado para el aislamiento, crecimiento y almacenamiento de hongos. En mi trabajo de investigación se utilizó medio agar-papa-dextrosa preparado (en forma de polvo deshidratado), de la marca Titan Media. Preparación: rehidratar 39 g del medio agar papa dextrosa en un matraz de 1000 ml con agua destilada, calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición por 1 minuto para disolverlo por completo. Agregar 50 gotas de ácido láctico (bactericida). Esterilizar en autoclave a 15 psi (121 °C) por 15 minutos. Enfriar aproximadamente a 45°C y vaciar la suspensión en cajas de Petri estériles (Gilchrists y col., 2005).

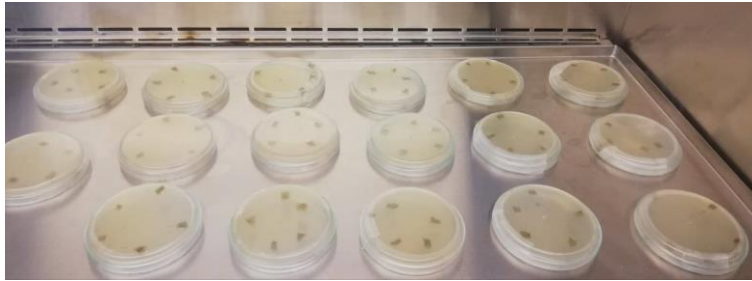
Anexo 2. *Medio de cultivo Agar Hoja de Clavel (CLA).*

Es un medio natural preparado asépticamente en donde se prepara agar agua al 2 % (20 g de agar en 1 L de H₂O) y se colocan de 5 a 10 trocitos de hojas de clavel estériles de 3 a 5 mm² en una caja Petri, de tal forma que queden en la parte superior del agar. El medio se deja a temperatura ambiente durante 3 a 4 días antes de su uso para comprobar el crecimiento de posibles contaminantes de las hojas.

Las piezas de hojas de clavel se preparan a partir de hojas frescas libres de residuos de fungicidas o insecticidas. Las hojas se esterilizan con hipoclorito al 5% durante 60 segundos; pasar las hojas por agua estéril para eliminar el exceso de hipoclorito. Luego se

cortan en pedazos de 5 a 8 mm² (se encojen después del secado) y se secan en una estufa a 70°C durante 3 a 4 horas. Las hojas secas se empaican en papel aluminio y se esterilizan por luz ultravioleta durante 20 minutos (Gilchrist y col., 2005).

Anexo 3. *Placa petri conteniendo medio de cultivo CLA en la cámara de flujo laminar.*



Fuente: Autor

Anexo 4. *Protocolo de Alvarado, 2010 para la extracción de ADN.*

- Cada muestra se depositó en un tubo Eppendorf de 2 ml, al que se añadió 100 µl de la solución tampón de micropreparación (6.25 ml de tampón de extracción, 6.25 ml de tampón de lisis, 2.5 ml de sarcosyl 5%, 0.05 gr de bisulfito de sodio). Cada muestra se trituro con la ayuda de un pistón (se lavó el pistón con agua destilada entre cada triturado). Posteriormente se agregó 300 µl de tampón de micropreparación, se agitó ligeramente por vortex y se llevó a incubación en baño maría a 65 °C durante 2 horas. (Alvarado, 2010).

- Cumplido este tiempo se llenó cada tubo con un volumen de cloroformo isoamil alcohol (24:1), se agitó por vortex y se centrifugó a 10 000 rpm durante 5 minutos. El cloroformo isoamil alcohol desnatura las proteínas y las precipita, separándose del ADN que se mantiene disuelto. (Alvarado, 2010)

- El sobrenadante fue recuperado y se transfirió a un nuevo tubo al que se le adicionó 800 μ l de alcohol para precipitar el ADN y se centrifugo a 10 000 rpm durante 5 minutos. Luego se eliminó el alcohol y a cada tubo se le añadió 400 μ l de etanol al 70 % frío (en este estado el ADN puede ser conservado a -20 indefinidamente). Se eliminó el etanol y se colocó los tubos en papel absorbente durante 1 hora. El ADN se almaceno a -20 °C (Alvarado, 2010).

Anexo 5. *Cuantificaciones de ADN.*

Concentraciones de ADN de las cepas de Fusarium spp.

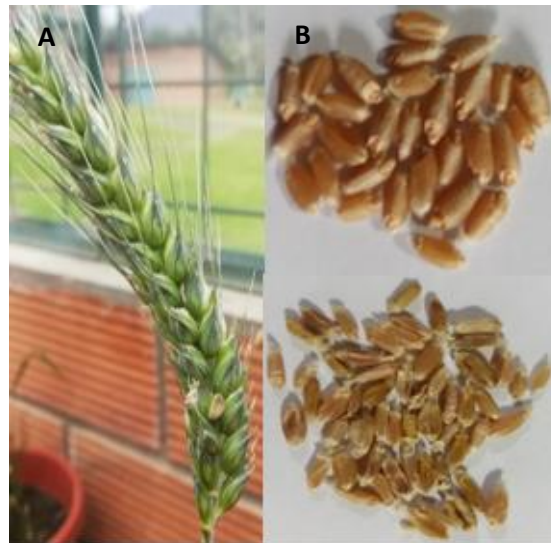
Aislado	Código de muestra	Concentración ng/μl	
		repetición 1	repetición 2
1	M3	97,00	106,5
2	059B	129,1	99,30
3	04	92,50	74,10

Fuente: Autor

Anexo 6. Espigas infectadas por las tres cepas de Fusarium spp. de cada una de las seis variedades de trigo evaluadas, a los 21 días post inoculación.

INIAP-COJITAMBO 92

INIAP-COJITAMBO 92. (A) Espiga infectada por cepa 1. B) Grano sano, grano enfermo.



INIAP-COJITAMBO 92. (A) Espiga infectada por cepa 2. B). Grano sano, grano enfermo

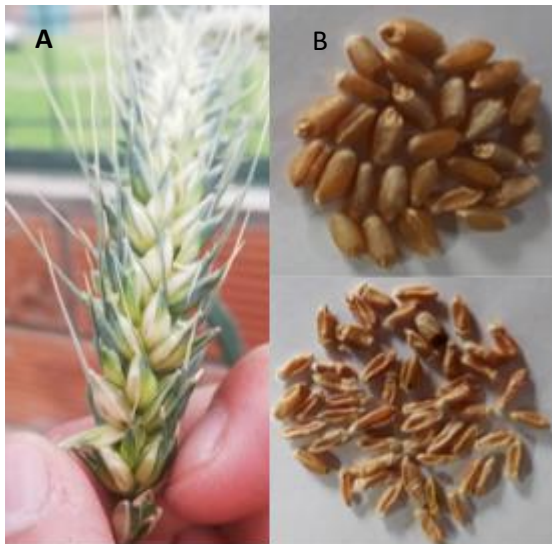


Figura 13: INIAP-COJITAMBO 92. (A) Espiga infectada por cepa 3. B). Grano sano, grano enfermo



INIAP-IMBABURA 2014

INIAP-Imbabura 2014. (A) Espiga infectada por cepa 1. B). Grano sano, grano enfermo



INIAP-Imbabura 2014. (A) Espiga infectada por cepa 2. B). Grano sano, grano enfermo

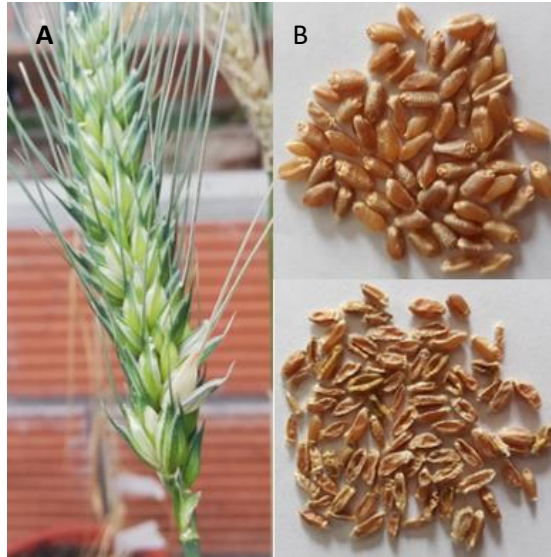


INIAP-Imbabura 2014. (A) Espiga infectada por cepa 3. B). Grano sano, grano enfermo

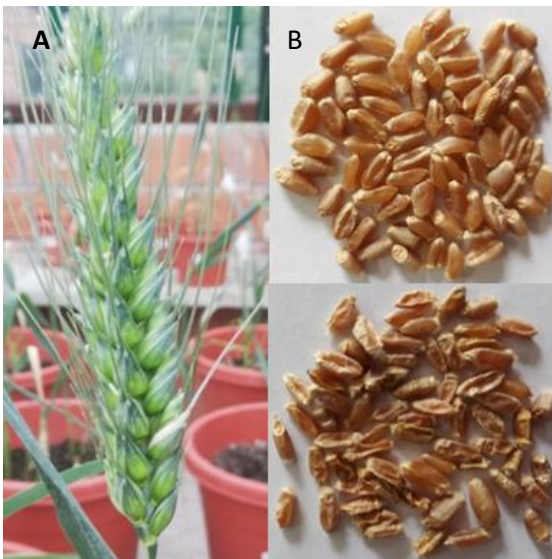


INIAP-SAN JACINTO 2010

INIAP-SAN JACINTO 2010. (A) Espiga infectada por cepa 1. B). Grano sano, grano enfermo



INIAP-SAN JACINTO 2010. (A) Espiga infectada por cepa 2. B). Grano sano, grano enfermo

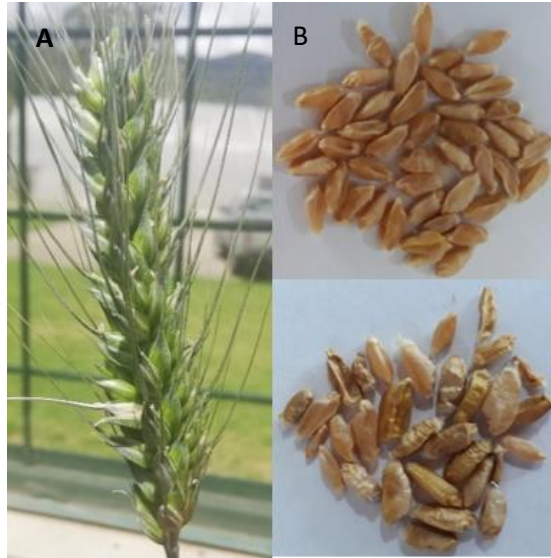


INIAP-SAN JACINTO 2010. (A) Espiga infectada por cepa 3. B). Grano sano, grano enfermo



INIAP-VIVAR 2010

INIAP-VIVAR 2010. (A) Espiga infectada por cepa 1. B). Grano sano, grano enfermo



INIAP-VIVAR 2010. (A) Espiga infectada por cepa 2. B). Grano sano, grano enfermo



INIAP-VIVAR 2010. (A) Espiga infectada por cepa 3. B). Grano sano, grano enfermo

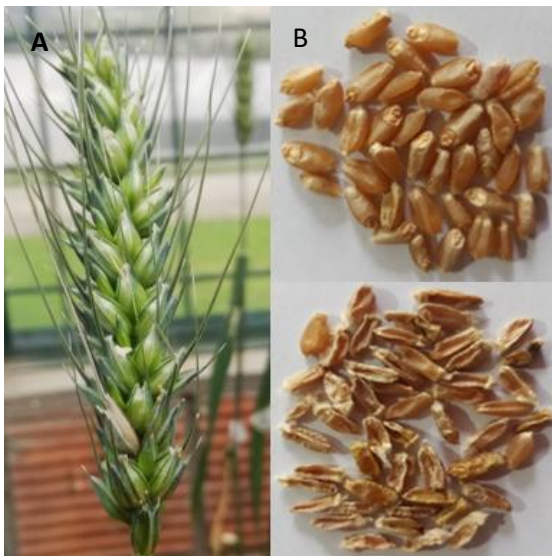


INIAP-MIRADOR 2010

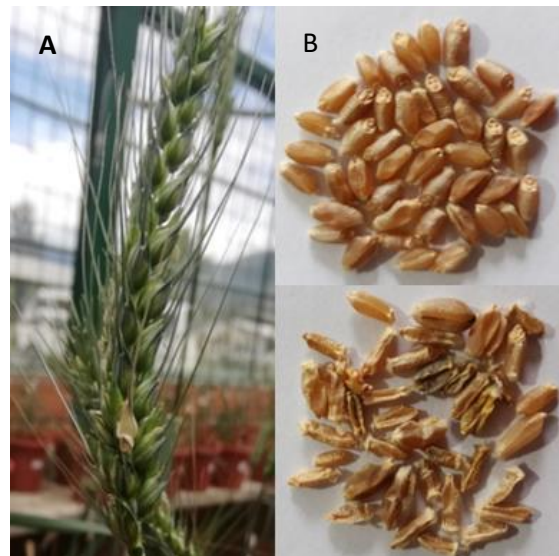
INIAP-MIRADOR 2010. (A) Espiga infectada por cepa 1. B). Grano sano, grano enfermo



INIAP-MIRADOR 2010. (A) Espiga infectada por cepa 2. B). Grano sano, grano enfermo



INIAP-MIRADOR 2010. (A) Espiga infectada por cepa 3. B). Grano sano, grano enfermo

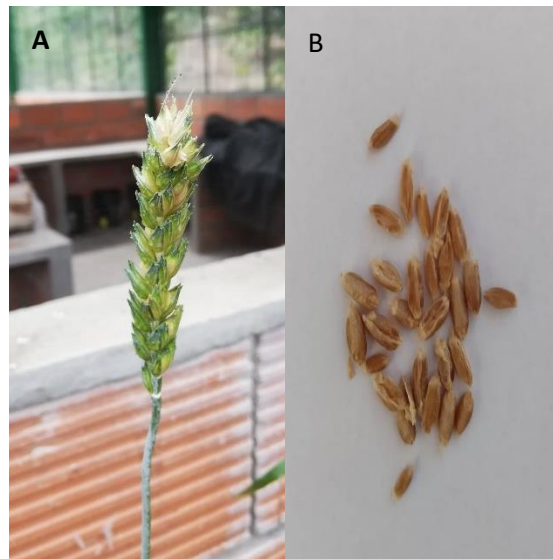


INIAP-CHIMBORAZO

INIAP-CHIMBORAZO. (A) Espiga infectada por cepa 1. B). Grano sano, grano enfermo.



INIAP-CHIMBORAZO. (A) Espiga inoculada con combinación de inóculos. B). Grano enfermo.



Anexo 7. *Siembra de variedades e inoculación de conidios de Fusarium spp.*

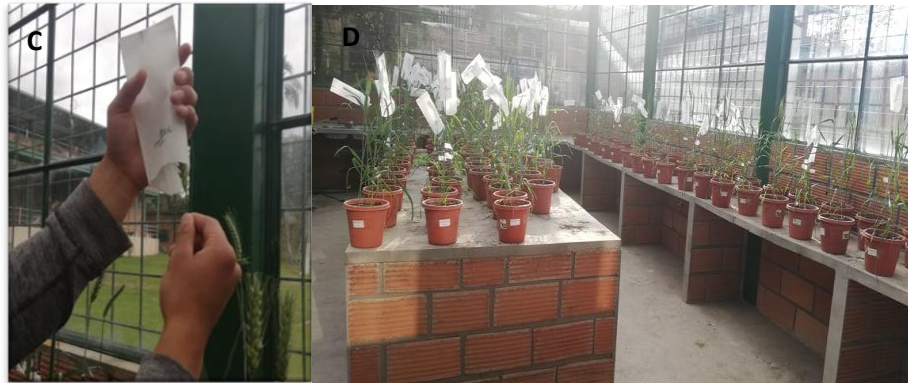
(A) Llenado de macetas y (B) Siembra de las variedades de trigo



Fuente: Autor

(A) y (B) Inoculación de cepas de Fusarium spp., en espiguilla. (C) y (D) Colocación de papel glasine sobre la espiga





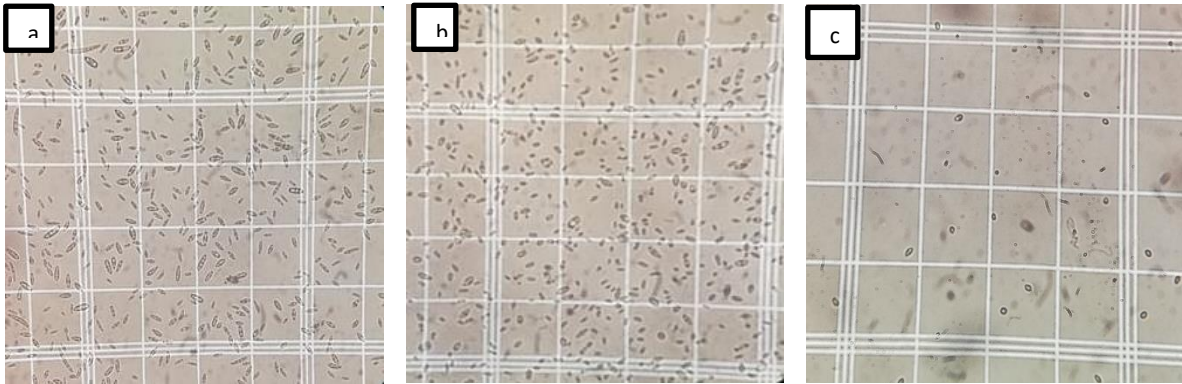
Fuente: Autor

Anexo 8. Riego de plantas de trigo mediante sistema de microaspersión.



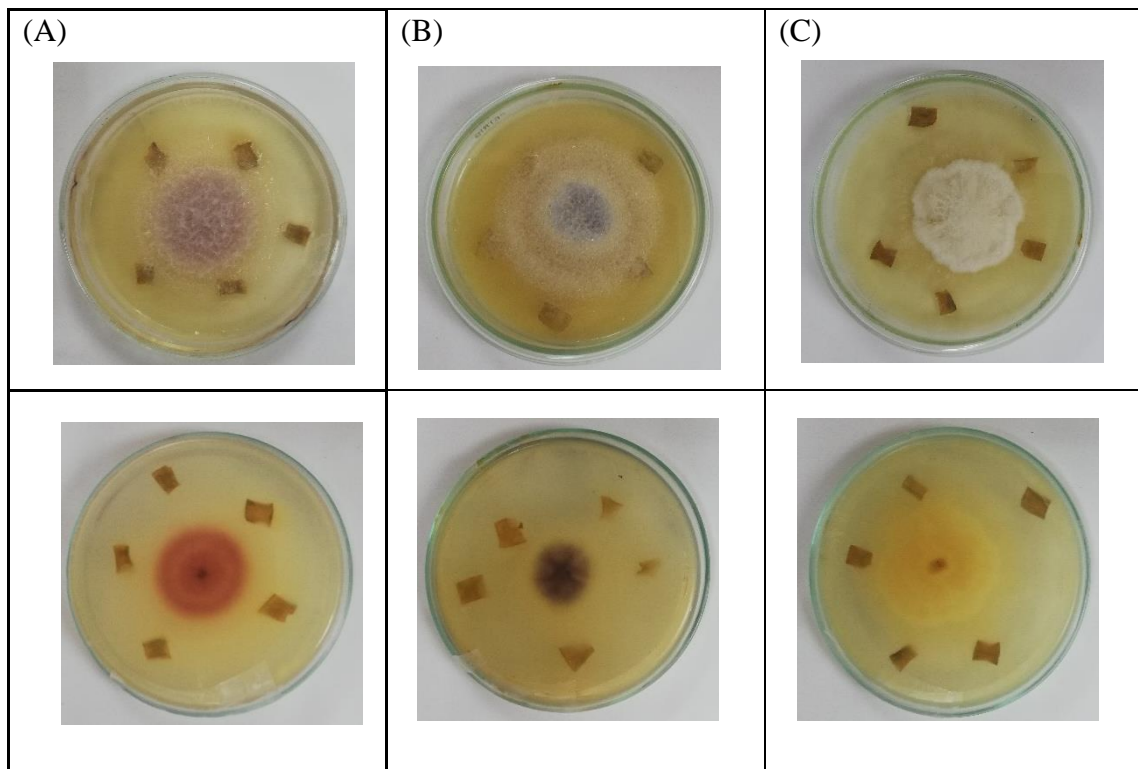
Fuente: Autor

Anexo 9. Observación de conidios de *Fusarium* spp. en cámara de Neubauer, de 30 días de edad. (A) cepa 1, (B) cepa 2, (C) cepa 3.



Fuente: Autor

Anexo 10. Cepas de *Fusarium* spp. de 30 días de edad en medio de cultivo CLA. Imagen superior muestra el anverso (micelio) y la imagen inferior, reverso la pigmentación de cada una de las cepas. (A) cepa 1 (B) cepa 2 y (C) cepa 3.



Fuente: Autor

Anexo 11. *Tabla de colores utilizadas para la caracterización morfológica.*

RV 189 / Ipanema Yellow	RV 30 / Electric Blue	RV 192 / Sundance	RV 182 / Deep Blue
RV 20 / Party Yellow	RV 5006 / Dark Blue	RV 102 / Daltai Orange	RV 183 / Poseydon Blue
RV 109 / Canarias Yellow	RV 154 / Twister Blue	RV 103 / Plural Orange	RV 186 / Virgin Green
RV 1021 / Light Yellow	RV 185 / Angel Blue	RV 50 / Solar Orange	RV 142 / Gemini Green
RV 110 / Yosemite Yellow	RV 157 / Thalassa Blue	RV 105 / Tangerine	RV 6027 / Luminous Green
RV 111 / Babel Green	RV 158 / Perseus Blue	RV 106 / Lava Orange	RV 144 / Ball Green
RV 112 / Mission Green	RV 159 / Odyssey Blue	RV 2004 / Orange	RV 145 / Erasmus Green
RV 113 / Dragon Green	RV 160 / Eureka Blue	RV 107 / Mars Orange	RV 5018 / Turquoise
RV 114 / Maya Green	RV 161 / Taunani Blue	RV 108 / Phoenix Orange	RV 146 / Glory Blue
RV 191 / Jaima Brown	RV 127 / Era Green	RV 190 / Malta White	RV 147 / Pegasus Blue
RV 94 / Dingo Brown	RV 6008 / Amazona Green	RV 1013 / Bone White	RV 148 / Hercules Blue
RV 95 / Tana Brown	RV 188 / Shining Green	RV 135 / Safari Brown	RV 187 / Vespa Green
RV 96 / Montserrat	RV 1016 / Lemon Yellow	RV 136 / Inca Brown	RV 124 / Frisco Green
RV 97 / Chiapas Brown	RV 129 / Oregon Green	RV 137 / Pastboard Brown	RV 16 / Pistachio Green
RV 98 / Bean Brown	RV 80 / Krypton Green	RV 138 / Marrakech	RV 125 / Neon Green
RV 99 / Marron Glace	RV 130 / Euskadi Green	RV 139 / Sequoia Brown	RV 34 / Guacamole Green
RV 100 / Coffee Brown	RV 131 / Comarca Green	RV 140 / Mole Brown	RV 6018 / Valley Green
RV 101 / Ebony Brown	RV 132 / Borneo Green	RV 141 / Gondola Brown	RV 126 / Toscana Green
RV 193 / Chewing gum	RV 133 / Dhama Green	RV 194 / Supernova Pink	RV 180 / Thai Green
RV 115 / Tutti Frutti	RV 134 / Infinity Green	RV 164 / Tokyo Pink	RV 161 / Eden Green
RV 3017 / Fever Red	RV 177 / Eidorado	RV 165 / Orchid Pink	RV 267 / Sulfur Yellow
RV 116 / Blood Red	RV 176 / Tibet	RV 4003 / Erika	RV 266 / Psycho Green
RV 3001 / Vivid Red	RV 8003 / Mustard	RV 4010 / Magenta	RV 265 / Sonar Green
RV 47 / Clandestine Red	RV 199 / Java Green	RV 166 / Apal Red	RV 261 / Laser Green
RV 3004 / Bourdeaux Red	RV 182 / Emerald Green	RV 167 / Rioja Red	RV 262 / Laos Green
RV 3007 / Cherokee Red	RV 183 / Beryl Green	RV 168 / Anger Red	RV 280 / Hulk Green
RV 77 / Night Red	RV 179 / Bonsai Green	RV 169 / Taurus Red	RV 272 / Mint Green

Fuente: Autor

Anexo 12. Esquema del diseño experimental para el análisis de las 3 cepas (FA) y días (FB), para la variable diámetro del crecimiento del micelio de *Fusarium* spp.

Rep	Cepas	d1	d2	d3	d4	d5
1	C1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	C1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	C1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
4	C1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	C2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	C2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	C2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
4	C2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	C3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	C3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	C3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
4	C3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Fuente: Autor

Anexo 13. Arreglo factorial con un DCA, para la variable severidad. Arreglo factorial de 5 variedades (FA) por 3 cepas (FB) más 2 testigos adicionales (17 tratamientos) con 5 repeticiones, con un total de 85 unidades experimentales.

Tratamientos	Variedades (FA)	Cepas (FB)	R1	R2	R3	R4	R5
1	INIAP-COJITAMBO 92	C1					
2	INIAP-COJITAMBO 92	C2					
3	INIAP-COJITAMBO 92	C3					
4	INIAP-IMBABURA 2014	C1					
5	INIAP-IMBABURA 2014	C2					
6	INIAP-IMBABURA 2014	C3					
7	INIAP-SAN JACINTO 2010	C1					
8	INIAP-SAN JACINTO 2010	C2					
9	INIAP-SAN JACINTO 2010	C3					
10	INIAP-VIVAR 2010	C1					
11	INIAP-VIVAR 2010	C2					
12	INIAP-VIVAR 2010	C3					
13	INIAP-MIRADOR 2010	C1					
14	INIAP-MIRADOR 2010	C2					
15	INIAP-MIRADOR 2010	C3					
16	TP I_Chimborazo Inoculado con aislados						
17	TN I_Chimborazo Inoculado con agua destilada						

Fuente: Autor

- C1= cepa 1 (M3)
- C2= cepa 2 (059B)
- C3= cepa 3 (04)

Anexo 14. Análisis estadístico de la variable diámetro del micelio de las tres cepas de *Fusarium* spp., durante 10 días. ANOVA dentro-entre sujetos con medias recortadas al 20%.

	Value	df1	df2	p-value
Día	3051.5748	4	6.9051	0e+00
Cepas	170.9765	2	9.6538	0e+00
Día: Cepa	20.1497	8	7.8499	2e-04

Fuente: Autor

Anexo 15. Resultados del análisis estadístico de la variable incidencia de las tres cepas de *Fusarium* spp. Prueba de hipótesis marginales (SC Tipo III) de los efectos fijos, para las cepas de *Fusarium* spp.

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	56	1127.81	<0.0001
Variedad	4	56	18.33	<0.0001
Cepa	2	56	19.95	<0.0001
Variedad: Cepa	8	56	6.73	<0.0001

Fuente: Autor

Anexo 16. Medias ajustadas y error estándar para el factor variedad de la variable incidencia DGC ($\alpha=0.05$) con la corrección de Bonferroni.

Variedad	Means	S.D.	Rango
I_SAN_JACINTO_2010	97.78	8.61	a
I_COJITAMBO_92	90.00	21.64	a
I_MIRADOR_2010	80.00	27.60	b
I_VIVAR_2010	63.33	22.89	c
I-IMBABURA_2014	57.78	46.23	c

Means with a common letter are not significantly different ($p > 0.05$)

Fuente: Autor

Anexo 17. Medias ajustadas y error estándar para el factor cepa de la variable incidencia DGC ($\alpha=0.05$) con la corrección de Bonferroni.

Cepas	Means	S.E.	Rango
Cepa 1	90.00	3.92	a
Cepa 2	85.33	3.92	a
Cepa 3	58.00	3.92	b

Means with a common letter are not significantly different ($p > 0.05$)

Fuente: Autor

Anexo 18. Resultados del análisis estadístico de la variable severidad de las tres cepas de *Fusarium* spp. Prueba de Levene para homogeneidad de varianza (17 tratamientos).

	Df	F value	Pr(>F)
Grupo	16	0.6561	0.8255
	68		

Fuente: Autor

Anexo 19. Análisis de la varianza para la variable severidad con la función “ExpDes” en el programa R de las tres cepas de *Fusarium* spp.

	DF	SS	MS	FC	Pr>Fc
Variedades	4	15.90485	3.97621	11.0358	0
Cepas	2	21.33552	10.66776	29.6079	0
Variedades*Cepas	8	19.37798	2.42225	6.7229	0
Factor vs Testigos	1	5.47984	5.47984	15.2091	2e-04
Testigo Positivo vs Testigo Negativo	1	36.67225	36.67225	101.7824	0
Residuo	68	24,50044	0,36030		
Total	84	123.27089	1.46751		

Fuente: Autor

Anexo 20. Efectos simples del factor variedad para la variable severidad Test: Tukey Alpha: =0.05 LSD: =0.61396. Error: 0.3600 df:68.

Variedad	Media	D.E.	S.E.	Rango
I_SAN_JACINTO_2010	5.04	0.55	0.14	a
I_MIRADOR_2010	4.80	0.91	0.24	ab
I_VIVAR_2010	4.74	0.91	0.23	ab
I_COJITAMBO_92	4.42	0.61	0.16	b
I-IMBABURA_2014	3.71	1.49	0.38	c

Fuente: Autor

Anexo 21. Efectos simples del factor cepa para la variable severidad. Test: Tukey Alpha: =0.05 LSD: =0.40663. Error: 0.3600 df:68.

Cepas	Media	D.E.	S.E.	Rango
Cepa 1	5.02	0.78	0.16	a
Cepa 2	4.81	0.62	0.12	a
Cepa 3	3.80	1.20	0.24	b

Fuente: Autor