

**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**Caracterización polifásica de *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*,
asociado con garbanzo (*Cicer arietinum*) y evaluación de líneas
promisorias de garbanzo resistentes a marchitez**

Por:

Rosa Marina Arvayo Ortiz

TESIS APROBADA POR LA:

Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal

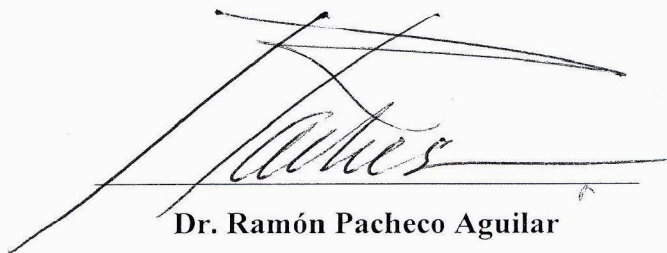
Como requisito parcial para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD).

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'R. Pacheco', is written over a horizontal line. The signature is stylized and somewhat cursive.

Dr. Ramón Pacheco Aguilar

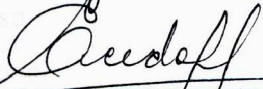
Director General

APROBACIÓN

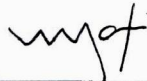
Los miembros del comité asignados para revisar la tesis de Rosa Marina Arvayo Ortiz, la han encontrado satisfactoriamente y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias



Dr. Martín Esqueda Valle
Director de Tesis



Dra. Evelia Acedo Félix
Asesor



Dr. María Auxiliadora Islas Osuna
Asesor



Dr. Martín E. Tiznado Hernández
Asesor

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo prestado durante el posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo por recibirme en este programa y por todo el apoyo durante el mismo.

A la Universidad de Sonora por apoyarme en la realización de este doctorado.

A INIFAP por proporcionarme las semillas de garbanzo necesarias para concluir este trabajo de investigación, especialmente al Ing. José Antonio Morales.

Mi más sincero agradecimiento a mi director de tesis Dr. Martín Esqueda Valle por haberme aceptado como su estudiante y cuya acertada dirección me permitió superarme y continuar en la búsqueda de nuevos conocimientos.

A la Dra. Evelia Acedo Félix por su generosidad al brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y conocimientos en un marco de amistad y confianza, los cuales fueron muy valiosos para realizar este trabajo.

A la Dra. María Auxiliadora Islas Osuna y al Dr. Martín Tizado Hernández por su disponibilidad y por sus acertadas correcciones y sugerencias.

A Javier Ojeda y a la Dra. Teresa Gollás por permitirme utilizar su equipo de laboratorio.

Al M. en C. Alfonso Sánchez por su valiosa ayuda en la realización de este trabajo.

Al M. en C. Aldo H. Gutiérrez por su apoyo técnico y su valiosa ayuda para concluir este trabajo de investigación.

A Q.B. Rosalba Pérez por su apoyo técnico en los análisis moleculares.

A Biol. Georgina Vargas Rosales por su apoyo técnico en los ensayos de patogenicidad.

A las Coordinadoras de Posgrado Dra. Ana M. Calderón y Dra. Gloria Yépiz Plascencia por todas sus atenciones.

Al personal administrativo y mantenimiento de la DTAOV y del Laboratorio de Microbiología Molecular.

A mis compañeros y amigos del laboratorio: Lupita, Citlalli, Deladier, Tania, Fátima, Eduardo, Carolina, Javier Ojeda, Alberto Sánchez, Antonio Orozco, Alfonso García, Alejandra, Marisa, Mónica.

Dedicatoria

A Dios por sus bendiciones

A mi familia, especialmente a mi esposo Abelardo y mi hija Marina por todo su cariño, y apoyo para continuar superándome.

A mis padres, con todo cariño y respeto, por confiar siempre en mi y cuyas enseñanzas nunca olvidaré.

A mis hermanos por su cariño y confianza.

A todas las personas que de algún modo contribuyeron a que esto fuera posible.

Contenido

	Página
Agradecimientos	iv
Dedicatorias	v
Resumen	vii
Introducción general	1
Integración del trabajo de investigación	6
Hipótesis	7
Objetivo general	7
Objetivos particulares	7
Capítulo I	8
Morphological Variability and Pathotypes of <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>ciceris</i> Associated with Chickpea (<i>Cicer arietinum</i> L.) Crops	
Capítulo II	17
Evaluación de líneas promisorias de garbanzo frente a marchitez por <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>ciceris</i>	
Conclusiones	38
Literatura citada	39

RESUMEN

México ocupa el tercer lugar mundial como productor y exportador de garbanzo blanco, donde Sinaloa y Sonora generan el 70 y 20 %, respectivamente. La enfermedad del garbanzo conocida como fusariosis vascular causada por el hongo *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* (FOC), ocasiona pérdidas hasta del 60 % en Sonora. El objetivo de este trabajo fue aislar y caracterizar fenotípica y genotípicamente a FOC, analizar los factores físicos y químicos de los suelos donde se desarrolla y determinar la resistencia de líneas promisorias de garbanzo. El muestreo se realizó en plantas enfermas localizadas en 12 áreas de cultivo localizadas en Los Mochis y Guamúchil, Sinaloa; La Costa de Hermosillo y Valle del Yaquí, Sonora. Se realizó la caracterización fenotípica a partir de aislamientos del hongo en PDA y la caracterización genotípica en base al análisis de ADN genómico utilizando PCR-específica con iniciadores específicos para razas patógenas de FOC. La evaluación de la resistencia se realizó mediante un ensayo de patogenicidad con las razas 0 y 5 de FOC durante 50 días, en las líneas Hoga-012, Hoga-490-2 y Hoga-508, Blanco Sinaloa-92 y Costa-2004, incluyendo como control positivo la línea susceptible JG-62 y negativo la línea resistente WR-315. Se observaron diferencias en los análisis físicos y químicos del suelo entre las áreas de cultivo ($P < 0.05$). El contenido de materia orgánica fue bajo en todos los campos, el pH fue neutro y ligeramente alcalino, las variables que más influyeron fueron la salinidad y la textura del suelo, observándose la conductividad eléctrica más alta en un campo de Guamúchil con 6.3 dS m^{-1} . A partir de 355 aislados se obtuvieron 161 cepas positivas de FOC, con una variabilidad significativa en el tamaño de las macro- y microconidias. La variabilidad morfológica de FOC fue alta ($P < 0.05$); sin embargo, no está determinada por las propiedades físicas y químicas de los suelos o por la ubicación geográfica de los campos. De las cepas de FOC analizadas, 91 fueron identificadas como raza 0 (41 %), raza 1B/C (15 %), raza 5 (14 %) y raza 6 (28 %). Las líneas Hoga-012, Hoga-490-2 y Hoga-508, así como los cultivares BS-92 y Costa-2004 presentaron un desarrollo significativo de marchitez ($P < 0.05$) ante las razas 0 y 5 de FOC presentes en Sonora. JG-62 mostró susceptibilidad a todas las razas, mientras que WR-315 fue resistente. En todos los tratamientos se comprobó que la marchitez fue causada por las razas de FOC.

Por lo que se deberá continuar en la búsqueda de genotipos resistentes a través de programas de mejoramiento para coadyuvar en el control de la enfermedad.

INTRODUCCIÓN GENERAL

El garbanzo es un cultivo con alto valor nutricional ya que contiene una cantidad alta de proteína (25-29 g proteína/100g), la cual es fácilmente digerible e hipocolesterolémica. Además contiene vitaminas y macroelementos por lo que se considera un producto dietario altamente nutritivo en muchos países del mundo (Gupta *et al.*, 2009), entre ellos la región Mediterránea, el Sudeste Asiático y otros países (Saxena, 1990; Singh y Ocampo, 1997). En México los principales estados productores y exportadores de garbanzo blanco “Kabuli” son Sinaloa (70 %), Sonora (20 %) y Baja California Sur (5 %), con una producción anual de 200,000 ton y rendimientos de 2.5 ton ha⁻¹ (Manjarrez-Sandoval *et al.*, 2004).

Es un cultivo de invierno, tolerante a la sequía, sin embargo requiere humedad suficiente y temperaturas superiores a 5 °C para la germinación y formación de nódulos. El garbanzo se siembra desde noviembre hasta enero, las siembras tempranas producen mejores rendimientos que las tardías (Morales *et al.*, 2004). Es sensible a la salinidad y alcalinidad del suelo, de tal forma que valores de conductividad eléctrica mayores de 5 dS m⁻¹ afectan severamente a la planta. Asimismo, se ha observado que el garbanzo es sensible a la sodicidad del suelo, cuando el porcentaje de sodio intercambiable se eleva de 10 a 32 %, la acumulación de peso seco se reduce en un 50 % y si se aumenta a un 58 %, se detiene totalmente el crecimiento de la planta (Saxena, 1990).

Entre las enfermedades que limitan la producción de garbanzo está la fusariosis vascular, la cual es causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* (FOC). En España se reportan pérdidas del 10 al 15 % y en otros países entre 10 y 90 % (Landa *et al.*, 2006; Sharma y Muehlbauer, 2007). Sin embargo, la marchitez por *Fusarium* puede causar pérdidas del 100 %, cuando el cultivo está expuesto a condiciones adversas como el calor o por estrés de agua durante la fase reproductiva y el desarrollo de la cápsula (Landa *et al.*, 2006). En el noroeste de México, no se ha aislado y caracterizado fenotípica y genotípicamente a FOC asociado con plantas enfermas de garbanzo, por lo que el diagnóstico de la enfermedad se hace en base a la sintomatología de las plantas. En base a este análisis, se ha observado que la marchitez del garbanzo está presente en

los suelos de La Costa de Hermosillo, Sonora con pérdidas del 60 % (Morales *et al.*, 2004), mientras que en Sinaloa del 20 % (Manjarrez-Sandoval *et al.*, 2004).

Por mucho tiempo la “rabia” causada por *Didymella rabiei* (Kovatsch.) Arx (Navas-Cortés *et al.*, 1998) se consideró la enfermedad más importante del garbanzo en España. Sin embargo otros estudios indican que se presenta ocasionalmente, mientras que la “seca” o “fusariosis” ha aumentado. Se sugiere que la fusariosis pudiera incluir un complejo de enfermedades similar a la marchitez y pudrición de raíz (MPR), que reduce severamente la producción de semillas de garbanzo. Varios hongos se han reportado como los agentes del complejo MPR del garbanzo entre los cuales se mencionan a *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Macrophomina* y *Sclerotium*, mientras que las enfermedades foliares son causadas por *Botrytis cinerea* Pers., *Peronospora* sp., *Uromyces ciceris-arietini* (Grognot) Jacz. & G. Boyer y la marchitez es causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* Matuo & K. Sato (FOC) (Padilla-Valenzuela *et al.* 2008). La marchitez que incluye flacidez, amarillamiento y coloración vascular inducida por *F. oxysporum* es considerada como la enfermedad más importante en el complejo (Trapero-Casas, 1983).

Fusarium oxysporum f.sp. *ciceris* es un patógeno vascular que permanece en semilla y suelo, por lo que es difícil de manejar con el uso de químicos. Las clamidosporas del hongo pueden sobrevivir en el suelo en ausencia del hospedero por más de seis años (Stevenson *et al.*, 1995, Haware *et al.*, 1996). Este patógeno se disemina rápidamente, ataca la raíz de la planta y causa un estrés hídrico debido a la oclusión de los vasos conductores del xilema, acompañada de clorosis, necrosis y abscisión (Di Prieto *et al.*, 2001; Jiménez-Gasco *et al.*, 2004).

Se han descrito ocho razas de FOC: 0, 1A, 1B/C, 2, 3, 4, 5 y 6 (Haware y Nene, 1982, Jiménez-Díaz *et al.*, 1993), y dos biotipos de patogenicidad: Amarillamiento y marchitez. En el primero se presenta amarillamiento foliar y coloración vascular, y la planta muere a los 40 días de inoculación del patógeno. En el de marchitez se observa clorosis severa, flacidez y coloración vascular, y la planta muere a los 20 días de la inoculación (Jiménez-Gasco *et al.*, 2004). Las razas 0 y 1B/C corresponden a patotipos de amarillamiento, mientras que las razas 1A, 2, 3, 4, 5 y 6 a patotipos de marchitez. Las razas 1A, 2, 3 y 4 se han reportado en India y las razas 0, 1A, 1B/C, 5 y 6 en los Estados Unidos y España (Sharma *et al.*, 2005). En Siria, Túnez y Turquía se encuentran las

razas 0 y 1B/C; en Israel las razas 0, 1A y 6; así también las razas 1A y 6 en Marruecos, y la raza 0 en el Líbano (Halila y Strange, 1996; Jiménez-Gasco, 2001).

La variabilidad patogénica y genética del patógeno se ha caracterizado usando líneas diferenciales y marcadores de ADN (Haware y Nene, 1982; Jiménez-Díaz *et al.*, 1993, Sharma *et al.*, 2005, Dubey y Singh, 2008). La identificación de razas de FOC basados en el ADN puede ser el mejor método debido a que su genética no es afectada por parámetros medioambientales, además es rápida y precisa (Gurjar *et al.*, 2009). En estudios anteriores, los análisis RAPD se usaron con iniciadores basados en secuencias conocidas de ADN ribosomal o la secuenciación de iniciadores para caracterizar y diferenciar patotipos de amarillamiento y marchitez en FOC. Sin embargo, no se lograron identificar las razas patogénicas (Kelly *et al.*, 1994).

De acuerdo a esto, utilizando la técnica de análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) de ADN mitocondrial se obtuvieron patrones de restricción idénticos de siete razas de FOC (Pérez-Artes *et al.*, 1995). Por ello, para diferenciar aislamientos de FOC se han utilizado técnicas moleculares como RAPD-PCR, RFLP (Luna-Páez *et al.*, 2004), así como AFLP y SSR para estudiar la variabilidad entre poblaciones patogénicas de FOC (Dubey y Singh, 2008).

Basado en lo anterior, se han desarrollado marcadores específicos para ciertas razas (Sharma *et al.*, 2005). Así, la utilización de marcadores de secuencias conocidas de regiones amplificadas (SCAR) permitió identificar las razas 0, 1A, 5 y 6, presentes en el Mediterráneo (Jiménez-Gasco y Jiménez-Díaz, 2003). Además, se desarrollaron los iniciadores para PCR específica y se confirmaron mediante hibridación de los productos de PCR (Jiménez-Gasco y Jiménez-Díaz, 2003). El par de iniciadores específicos amplificó un producto sencillo de 1503 pb de todos los aislados de FOC y productos sencillos de 900 y 1000 pb se observaron para el caso de aislados de las razas 0 y 6 respectivamente.

Estos marcadores aún no se han desarrollado para razas FOC de la India, aunque su variabilidad basada en marcadores de ADN sí se ha evaluado (Gurjar *et al.*, 2009). Lo anterior mediante una combinación de métodos como la amplificación de región espaciadora transcrita interna (ITS)-RFLP, amplificación de secuencias repetidas intersimples (ISSR) y polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP).

Además, se realizó la secuenciación del factor de elongación de la traducción 1 alfa (EF-1 α) con lo cual fue posible identificar las razas de FOC de la India (Gurjar *et al.*, 2009). En un estudio se determinó la variabilidad genética en aislados procedentes de la India representativos de cuatro razas (1, 2, 3 y 4) de FOC a través de RAPD y AFLP (Honnareddy y Dubey, 2006). También se ha reportado con base en análisis filogenéticos de las secuencias del gen EF-1 α , que el estándar considerado anteriormente como raza 3-NRRL-32155 de FOC, corresponde a *Fusarium proliferatum* (Matsush.) Nirenberg ex Gerlach & Nirenberg (Gurjar *et al.*, 2009).

En nuestro estudio, una vez caracterizado el fenotipo de FOC en los aislados obtenidos de campos garbanceros de Sonora y Sinaloa, se procedió a la caracterización genética, mediante el análisis del ADN genómico utilizando la técnica de PCR en base a iniciadores específicos para razas de FOC. Más aún, se lograron identificar cuatro razas pertenecientes a los dos patotipos, a saber: raza 0 y 1B/C de amarillamiento, y razas 5 y 6 pertenecientes a patotipos de marchitez.

El patotipo de amarillamiento de FOC es menos virulento que el de marchitez, pero también pueden existir diferencias en virulencia entre razas de un mismo patotipo (Jiménez-Gasco *et al.*, 2005), debido a la interacción genética-ambiente. De acuerdo a la virulencia de las razas de FOC, la raza 0 es la menos virulenta y la raza 1B/C induce amarillamiento foliar progresivo en comparación con el marchitamiento severo inducido por las razas 1A a la 6 (Jiménez-Díaz *et al.*, 1993). Así mismo se ha observado que las razas 0 y 1B/C son diferencialmente patogénicas en el cultivar JG-62, a pesar de que comparten el mismo patotipo mientras que las razas 1B/C y 1A, que pertenecen a diferentes patotipos son moderada o altamente virulentas sobre el cultivar C104 (Jiménez-Gasco *et al.*, 2004).

Debido a lo anterior, en áreas productoras de garbanzo es sumamente importante identificar las razas de FOC, así como la caracterización de líneas y cultivares de garbanzo resistentes a razas específicas del patógeno, lo cual trasciende en los programas de mejoramiento. El manejo de marchitez por *Fusarium* puede lograrse por el uso de cultivares resistentes (Haware & Nene, 1982; Jiménez Díaz *et al.*, 1993; Honnareddy y Dubey, 2006) y el ajuste de fechas de siembra. Sin embargo varios factores influyen en la eficacia de estas prácticas de manejo como la variabilidad

patogénica en las poblaciones del hongo y factores abióticos como la temperatura y humedad. Por ejemplo, se sabe que la temperatura óptima para el desarrollo de FOC es entre 25 y 28 °C (Bhatti y Kraft, 1992).

Se han desarrollado líneas de garbanzo tipo “Kabuli” de alto rendimiento y con resistencia parcial o completa al marchitamiento por *Fusarium oxysporum* Schltdl. y *Didymella rabiei* (Kovatsch.) Arx (Navas-Cortés *et al.*, 1998). En Sonora, se han obtenido “líneas promisorias” de garbanzo por mejoramiento genético mediante hibridación a partir de cruzas y retrocruzas entre genotipos tipo “Desi” con variedades comerciales tipo “Kabuli” con la finalidad de obtener líneas mejoradas y con resistencia al patógeno (Morales *et al.*, 2004). La resistencia de la planta ante el patógeno varía regionalmente y por ello, las variedades mejoradas se evalúan a través de múltiples ensayos. Así mismo el conocimiento del fenotipo y el ambiente sobre el patógeno es esencial para diseñar un programa de mejoramiento efectivo y reducir las altas pérdidas ocasionadas por esta enfermedad (Sivaramakrishnan *et al.*, 2002).

El presente estudio fue elaborado con la finalidad de caracterizar fenotípica y genotípicamente a *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* asociado con plantas enfermas de garbanzo en el noroeste de México, utilizando marcadores moleculares; así como el análisis físico y químico de los suelos donde se desarrolla y evaluar la resistencia de líneas promisorias de garbanzo con las razas 0 y 5 de FOC, aisladas en campos garbanceros de La Costa de Hermosillo y Valle del Yaqui, Sonora.

INTEGRACIÓN DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

La información obtenida en este trabajo de investigación se presenta en forma de capítulos con formato de artículos de investigación, siguiendo la secuencia en la que fueron obtenidos y requeridos para contrastar la hipótesis planteada:

En el **Capítulo I:**

Morphological Variability and Pathotypes of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* Associated with Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Crops (Rosa Marina Arvayo-Ortiz, Martín Esqueda, Evelia Acedo-Félix, Alfonso Sánchez y Aldo Gutiérrez). Se presentan los resultados de la caracterización fenotípica y genotípica de *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* en plantas de garbanzo afectadas en 12 campos de Sonora y Sinaloa, y su relación con los factores físicos y químicos del suelo donde se desarrolla el fitopatógeno. Además la determinación por primera vez en México de cuatro razas patogénicas (R0, R1B/C, R5 y R6) de FOC.

En el **Capítulo II:**

Evaluación de líneas promisorias de garbanzo frente a marchitez por *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* (Rosa Marina Arvayo-Ortiz, Martín Esqueda, Evelia Acedo-Félix, Humberto González-Ríos y Georgina Vargas-Rosales). Se reportan los resultados de la evaluación de la resistencia de tres líneas promisorias de garbanzo: Hoga-012, Hoga-490-2 y Hoga-508, incluyendo los dos cultivares comerciales más importantes en México: Blanco Sinaloa-92 y Costa-2004, y como control dos cultivares: JG-62 (susceptible) y WR-315 (resistente), con las razas 0 y 5 de *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* identificadas por PCR-específica a partir de aislados obtenidos de 12 campos garbanceros de Sonora y Sinaloa. Además se confirman los postulados de Koch.

Hipótesis

Los síntomas de amarillamiento y marchitez presentes en las plantas de las zonas garbanceras de los principales estados productores y exportadores de México se debe a diferentes razas del hongo *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*, las cuales son patogénicas para líneas promisorias de garbanzo.

Objetivo general

Aislar y caracterizar fenotípica y genotípicamente a *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* asociado con plantas enfermas de garbanzo en el noroeste de México, así como los factores físicos y químicos del suelo donde se desarrolla y determinar la resistencia de líneas promisorias de garbanzo frente al hongo.

Objetivos particulares

1. Caracterizar los factores físicos y químicos del suelo donde se desarrolla el patógeno.
2. Aislar y caracterizar fenotípicamente cepas de *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*.
3. Determinar razas de *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* mediante PCR-específica.
4. Evaluar y determinar la resistencia de líneas nuevas de garbanzo vs. *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*.

Capítulo I

Morphological Variability and Pathotypes of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* Associated with Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Crops

Rosa Marina Arvayo-Ortiz, Martín Esqueda, Evelia Acedo-Félix,
Alfonso Sánchez and Aldo Gutiérrez

Artículo aceptado en American Journal of Agricultural and Biological Sciences

Morphological Variability and Races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* Associated with Chickpea (*Cicer arietinum*) Crops

Rosa Marina Arvayo-Ortiz, Martin Esqueda, Evelia Acedo-Felix,
Alfonso Sanchez and Aldo Gutierrez
Centre for Food Research and Development, A.C.
Km 0.6 road to La Victoria, 83304 Hermosillo, Sonora, Mexico

Abstract: Problem statement: Mexico is the third largest producer and exporter of chickpea (*Cicer arietinum*), with the states of Sinaloa and Sonora accounting for 70 and 20% of Mexico's production, respectively. The most damaging disease affecting this species is caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* (FOC), which causes losses of up to 60% in Sonora. The objective of this study was to isolate and characterize the phenotype and genetics of FOC collected from affected chickpea plants in northwestern Mexico and to identify the abiotic factors that allow it to develop. **Approach:** Sampling focused on affected plants from 12 crops in Sonora and Sinaloa. Based on 355 isolated strains, using Polymerase Chain Reaction (PCR) 161 were positive for FOC. **Results:** Of the 161 strains, 91 were identified as races previously recorded for the Americas: Yellowing (R0 (41%), R1B/C (15%) and wilting (R5 (14%) and R6 (28%)) reflecting the symptoms observed in the areas sampled. The other 70 isolates could be nonpathogenic, or could be races yet to be recorded for the Americas. **Conclusion:** Morphological variability in FOC was high in the main chickpea producing regions in northwestern Mexico and was not a function of the physical and chemical properties of the soil, nor of the geographic location of the cropfields. This is the first report of races of FOC in Mexico.

Key words: Phenotype, root rot, vascular wilt, *Fusarium oxysporum*, pathotypes, characteristics, cropfields microscopic northwestern, temperature, chemical, macroconidia, potassium, Polymerase Chain Reaction (PCR), FOC, *Cicer arietinum*

INTRODUCTION

Chickpeas (*Cicer arietinum* L.) are grown during winter under different agroclimate conditions in the northwestern states of Sinaloa, Sonora and Baja California in Mexico. Annual production is about 200,000 ton most of which is destined for the international market (Manjarrez-Sandoval *et al.*, 2004; Padilla-Valenzuela *et al.*, 2008). Chickpea crop yield varies depending on the cultivar, climate conditions and disease; among the latter are root rot caused by a complex of fungi such as *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Macrophomina* and *Sclerotium*, leaf diseases caused by *Botrytis cinerea* Pers., *Peronospora* sp., *Uromyces ciceris-arietini* (Grognot) Jacz. and G. Boyer and wilting caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* Matuo and K. Sato (FOC) (Padilla-Valenzuela *et al.*, 2008). FOC is quickly dispersed, attacks the root of the plant and causes hydric stress by blocking the xylem vessels and also

causes chlorosis, necrosis and abscission (Di Prieto *et al.*, 2001; Gupta *et al.*, 2009).

There are two pathotypes of the disease caused by FOC: yellowing and wilting. The first produces yellowing of the leaves and vascular discoloration and the plant dies 40 d after inoculation with the pathogen, while in the second, wilting, severe chlorosis, flaccidity and vascular discoloration occur and the plant dies 20 d after inoculation (Jimenez-Gasco *et al.*, 2004). In addition to the symptomology that FOC produces in chickpea, eight pathogenic races are known (0, 1A, 1B/C, 2, 3, 4, 5 and 6) and can be identified by the differential reactions they produce in the plant: yellowing is produced by 0 and 1B/C, while the others cause wilting. According to reports from different studies, the races have specific geographic distributions since 2, 3 and 4 have only been reported for India while 0, 1B/C, 5 and 6 have mainly been found in the Mediterranean region and in the United States of America (California). In contrast, race 1A has a broader

Corresponding Author: Martin Esqueda, Center for Food Research and Development, A.C. Km 0.6 road to La Victoria, 83304 Hermosillo, Sonora, Mexico Fax: +52 (662) 280-0422

End time

distribution and has been found wherever it has been looked for (Jimenez-Gasco *et al.*, 2004).

In the Mexican Bajío region, FOC isolates belonging to both pathotypes were obtained; their genetic variability was determined using PCR-RAPD, but there was no consistent information for distinguishing between strains by origin or plant symptomatology (Luna-Paez *et al.*, 2004). In northwestern Mexico the disease is diagnosed based on the plant's symptoms. Chickpea wilt has been detected in 60% of the soils of La Costa de Hermosillo, Sonora (Morales *et al.*, 2004), while in Sinaloa losses of 20% have been recorded (Manjarrez-Sandoval *et al.*, 2004) and losses of 10 to 90% have been reported for other countries (Landa *et al.*, 2006; Sharma and Muehlbauer, 2007).

There have been different attempts to control this disease, such as adjusting the sowing date and using resistant varieties of chickpea (Padilla-Valenzuela *et al.*, 2008). Among the factors that favor the development of FOC are excess soil humidity, particularly clayey soil with poor drainage, along with a deficiency of potassium and excess sodium (Walker, 1971). Among the factors that contribute to pathogenesis is temperature, with 25-28°C optimal for the development of FOC (Bhatti and Kraft, 1992). However, an increase from 24-27°C is sufficient to change the resistance of some varieties of chickpea and make them susceptible to this pathogen (Landa *et al.*, 2006).

The aim of this study was to isolate *F. oxysporum* f.sp. *ciceris*, characterize its phenotype and determine its pathogenic race and their relationship to abiotic factors where this fungus is found.

MATERIALS AND METHODS

Sampling sites: Based on the occurrence of chickpea yellowing and wilt, four locations were selected for sampling: in Sonora, La Costa de Hermosillo and Valle del Yaqui and in Sinaloa, Los Mochis and Guamúchil (Table 1). Three fields were sampled at each location with three quadrats per field. Samples were taken from plants showing signs of the disease. Ten plants were collected from each quadrat for a total of 360 chickpea root samples. Each plant was analyzed in triplicate, by placing five root sections in each Petri dish for a total of 5400 root fractions analyzed. All sampling sites were georeferenced using a geopositioning device (Garmin GPSmap 76S, Kansas, USA).

Strain isolation: FOC strains were obtained from the rhizoplane of the four most commonly grown varieties of chickpea in northwestern Mexico: Blanco Sinaloa 92, Aura, Teki Blanco and Costa 2004.

Table 1: Cropfields sampled, their location, chickpea variety and the percentage of roots infected with FOC

Cropfield ^a	N. Latitude	W. Longitude	Chickpea variety ^b	Percentage of roots with FOC± S.D
Sinaloa: Los Mochis				
LM1	25°50'04.6"	109°01'07.7"	BS	18±16
LM2	25°49'14.2"	108°55'47.8"	BS/A	32±15
LM3	25°44'32.7"	109°00'46.4"	BS	22±10
Guamúchil				
G1	25°10'41.3"	108°04'06.5"	BS	20±30
G2	25°25'26.4"	108°13'46.8"	BS	26±33
G3	25°17'48.6"	108°08'59.8"	BS	29±13
Sonora: La Costa de Hermosillo				
CH1	28°42'39.5"	111°33'20.6"	BS	28±13
CH2	28°47'40.9"	111°36'13.6"	TB/C	40±6
CH3	28°45'52.5"	111°20'09.9"	BS	29±5
Valle del Yaqui				
VY1	27°29'37.4"	110°09'26.9"	BS	48±8
VY2	27°29'22.3"	110°09'48.9"	BS	43±23
VY3	27°30'31.9"	110°10'56.8"	BS	56±15

^a. Cropfield names: LM1 = Compuertas, LM2 = Las Noventas, LM3 = Ejido Flores Magón, G1 = Rafael Buena, G2 = Penjamo, G3 = La Ilima, CH1 = Santa Lucia, CH2 = La Esperanza, CH3 = La Tinajita, VY1 = Block 213, VY2 = Block 215, VY3 = Block 217. ^b Chickpea variety: BS: Blanco Sinaloa 92; A: Aura; TB: Teki Blanco; C: Costa 2004

The roots of each one of the plants sampled were washed under running water, excess water was removed and the roots were cut into 1-2 cm sections. To eliminate surface tension from the roots, they were left in 50% ethyl alcohol for 30 s and then superficially disinfected by immersion in 2% sodium hypochlorite for 2 min. The chlorine was removed by washing the roots four times in sterile distilled water. Excess moisture was removed and five root sections were placed in each Petri dish which contained Potato Dextrose Agar (PDA; Difco) acidified to 1.4 with 10% tartaric acid and 500 mg L⁻¹ chloramphenicol. These were incubated at 25°C for 5-7 day (Nelson *et al.*, 1983; Burgess *et al.*, 1994).

Based on macro- and microscopic characteristics, colonies belonging to FOC were grown on PDA and monospore cultures were grown and then macroscopically characterized by color, appearance and growth rate after 7 day at 25°C; microscopically the size of their macroconidia, microconidia and chlamydospores was measured (Booth, 1975; Nelson *et al.*, 1983). A control strain of FOC was used (ATCC 200784).

Abiotic factors: Using thematic and digital maps (INEGI, 2000), the climate, geology, edaphology, physiography and hydrology of the sampling sites were obtained. The physical and chemical properties of the soil were also analyzed for 36 samples made up of 10 subsamples per quadrat. Following the methodology of Castellanos *et al.* (2000), the following were determined: pH, electrical conductivity, nitrate,

End time

Table 2: Primers used in the analysis of FOC strains

Primers	Primer Sequence (5'-3')	Race	Fragment size (Kb)
FOC-f	GGCGTTTCGAGCCTTACAATGAAG		
FOC-r	GACTCCTTTTCCCGAGGTAGGTCAGAT	FOC	1.5
FOC-0f	GGAGAGCAGGACAGCAAAGACTA		
FOC-0r	GGAGAGCAGCTACCTAGATACACC	R0	0.9
FOC-1B/Cf	GAGAGCAGGGTCAGCGTAGATAG		
FOC-1B/Cr	GCAGCAGAAGAGGAAGAAAATGTA	R1B/C	0.5
FOC-5f	GGAAGCTTGGCATGACATAC		
FOC-5r	AAGCTTGGGCACCCTCTT	R5	0.9
FOC-6f	GAGCAGTCAATGGCAATGG		
FOC-6r	AGAGCAGGGTCAGCGTAGATA	R6	1.0

phosphate and potassium concentration, as well as organic matter content and texture.

Statistical analysis: ANOVAs with a 5% level of significance were used to analyze the physical and chemical properties of the soil and the microscopic characteristics of the FOC strains. When there was a significant difference ($p \leq 0.05$) between fields, means were compared with a Tukey test in the SAS statistical computing software package (1994). In order to group the fields sampled based on their soil properties and the phenotypes of the FOC strains, data were subjected to a multivariate analysis and a principal component analysis using the NCSS software package (Hintze, 2007).

Characterization by PCR: With the PCR of the FOC primers and amplifying a 1500 bp fragment the FOC positive strains were identified. This was followed by specific PCR for the races reported for the Americas: 0, 1B/C, 5 and 6, the first two yellowing races and the last two wilt races (Jimenez-Gasco *et al.*, 2004). To determine the pathotype to which each of the strains identified as FOC belong, genomic DNA, was extracted using the commercial kit (ZR-Fungal) followed by PCR. In Table 2 the primers used to detect the FOC and pathotypes 0, 1B/C, 5 and 6 are given.

PCR conditions were: 94°C 10 min⁻¹; 36 cycles of 94°C 1 min⁻¹; 58°C 1 min⁻¹ and 72°C 1 min⁻¹; a polymerization cycle at 72 °C 5 min⁻¹ and 4°C storage temperature. Electrophoresis was done on 1.0% agarose gel in Tris-borate-EDTA buffer (TBE buffer) and the samples were dyed with ethidium bromide to visualize the amplified DNA using a UV transilluminator and a picture was taken with a Polaroid camera (Kodak).

RESULTS

Isolation of FOC: Based on the 360 diseased garbanzo plants (varieties Blanco Sinaloa 92, Costa 2004, Aura and Teki Blanco) with symptoms of yellowing and

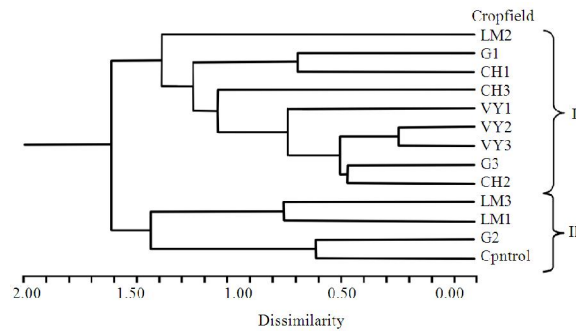


Fig. 1: Dendrogram generated with UPGMA based on Euclidian distances for the macro- and microscopic characteristics of FOC

wilting, 355 strains belonging to *Fusarium* were isolated, 161 of which were positive for FOC. Per field, these had the following proportion of the FOC strains: Valle del Yaqui (36.0%), La Costa de Hermosillo (24.8%), Guamúchil (20.5%) and Los Mochis (18.7%).

Morphological variability of FOC: The multivariate analysis of the macro- and microscopic characteristics of the 161 FOC strains returned two large clades with a dissimilarity of 1.52 (Fig. 1). All the cropfields studied in Sonora, two from Guamúchil (G1 and G3) and one from Los Mochis (LM2) formed one clade; the remaining cropfields from Sinaloa were in the other. These two clades give rise to eight subgroups, with fields VY3 and VY1 the most similar (0.35), while the strains from G2 were most similar to the control strain.

For the macroscopic characteristics, the color of the strains went from whitish (groups 1, 3, 5 and 6), brownish-white (groups 2 and 4), pinkish-white (group 7), to purplish-brownish-white (group 8).

The appearance of the colony varied from cottony with an abundant mycelium (groups 1 and 2), patchily cottony (groups 3 and 6), cottony velvet (groups 4 and 5), cottony-feathery (groups 1 and 7) and patchily cottony velvet (group 8).

At the microscopic level, the mean length of the macroconidia was 16.5-34.1 μm for the eight groups (Table 3), with the two extremes recorded in the fields in Sinaloa, LM3 and LM2 respectively ($p \leq 0.05$); most had 2-4 septa. Mean length for the other fields were similar to that of the control ($p > 0.05$). Mean macroconidia width was the same as that of the control ($p > 0.05$), with the exception of the samples from cropfield VY2 (4.2 μm). In Fig. 2, the macro- and microscopic characteristics of the FOC strains isolated are given.

End time

Table 3: Microscopic characteristics and growth rate of FOC strains

Group	Cropfield	Macroconidia (μm)		Microconidia (μm)		Chlamydospores (μm) D	GR cm 7 day
		L	W	L	W		
1	VY1	22.4bcde	3.4ab	8.4a	2.8ab	6.9abc	6.5a
	VY3	24.9cde	3.6ab	7.8a	3.0ab	8.2ab	7.0a
2	G3	18.4ed	3.2ab	7.6a	3.0ab	7.4ab	6.0a
	CH2	27.2ab	3.7ab	8.9a	2.9ab	6.9abc	7.5a
3	G2	19.5cde	2.8ab	7.2a	2.6ab	8.1ab	7.0a
	Control	21.9bcde	2.6b	7.8a	2.5b	7.4ab	7.0a
4	G1	21.2bcde	3.7ab	7.9a	2.9ab	8.1a	7.0a
	CH1	20.3bcde	3.7ab	7.5a	3.2ab	8.0ab	7.0a
5	LM3	16.5e	3.1ab	7.6a	2.9ab	4.8c	7.5a
	LM1	17.4ed	3.1ab	7.9a	2.9ab	6.5abc	7.0a
6	VY2	26.6abc	4.2a	8.8a	2.7ab	5.8bc	7.5a
7	CH3	23.0bcde	3.9ab	9.1a	3.3a	6.2ab	7.5a
87	LM2	34.1a	3.6ab	9.8a	3.0ab	7.2abc	7.0a

L = Length; W = Width; D = Diameter; GR = Growth Rate. Means in the same column but with different letters are statistically different ($p \leq 0.05$)

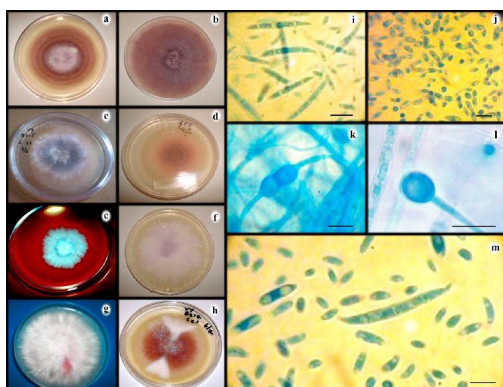


Fig. 2: Macro- and microscopic characteristics of FOC strains. (a) control strain, violet-velvety (b) group 2, whitish-violet-cottony (c) group 6, patchily violet (d) group 4, whitish-cottony (e) group 1, 3, 5 and 6, pinkish-whitish-cottony (f, g) group 1 and 4, violet-brown-whitish-feathery (h) groups 1 and 7, brown-violet-whitish-feathery (i) fusiform macroconidia, with 2-4 septa (j) oval, unicellular microconidia (k) intercalary chlamydospores in pairs (l) terminal chlamydospore (m) control strain, macro- and microconidia. Scale bar: 10 μm

Microconidia were abundant, unicellular, oval and did not vary significantly in length ($p > 0.05$) (Table 3), although width was significantly different for the samples from cropfield CH3 (3.3 μm) ($p \leq 0.05$). Length and width means ranged from 7.2-9.8 \times 2.5-3.3 μm . Chlamydospores had a thick wall, were spherical and had an intercalary or terminal location. Mean diameter was 4.8-8.1 μm , chlamydospore size for the eight groups was the same as that of the control ($p > 0.05$), with the exception of cropfield LM3 (4.8 μm). At day 7

the growth rate of the strains was between 6 and 7.5 cm ($p > 0.05$) (Table 3).

The principal component analysis revealed that macroconidia length is the variable that most influences differentiation between the fields studied for the morphological characteristics of FOC. The first principal component explains 92% of the total variation. This is confirmed in Fig. 1 which shows that the most dissimilar field was LM2 where the greatest mean macroconidia length was recorded (Table 3).

Abiotic factors: The physical and chemical properties of the soil all differed significantly among the cropfields ($p < 0.05$; Table 3). pH was 6.9 (LM1 and G1) to 7.9 (VY2 and VY3). Electrical conductivity (EC) was 1.6 (LM3 and VY2) to 6.3 dS m^{-1} (G3). Na^+ concentration was below 5 mg L^{-1} in all cropfields, except in G3 (11.8) and CH2 (6.5). Cl^- was lower than 5 meq L^{-1} in all cropfields, except G1 (8.4) (data not shown). The lowest nitrate concentration was recorded for field G1 (20 mg kg^{-1}) and the values for all the other fields were higher than 30 mg kg^{-1} . In G1, G2 and G3 phosphate concentration was less than 30 mg kg^{-1} (the minimum acceptable for agricultural crops) and in the other fields it was higher. In all of the cropfields, potassium concentration was greater than 150 cmol kg^{-1} , the minimum recommended for agricultural land. Organic matter content was low in all of the cropfields from 1.1 (LM2 and CH1) to 1.8% (G1 and VY1). Soil texture ranged from clayey to loam, through silty clay and silty clay loam (Table 4).

The multivariate analysis of the physical and chemical properties of the soil revealed that field G3 in Sinaloa was the most dissimilar (2.22), followed by CH2 in Sonora. The remaining fields fell into two clades: one comprised of the Sonora fields and cropfield G2 in Guamúchil, Sinaloa and the other comprised only of the remaining fields in Sinaloa (Fig. 3).

End time

Table 4: Physical and chemical soil analysis for the fields sampled

Cropfield	pH	EC (dS m ⁻¹)	N-NO ₃ ⁻ (mg kg ⁻¹)	P-PO ₄ ⁼ (mg kg ⁻¹)	K (cmol kg ⁻¹)	OM(%)	Texture
Sinaloa							
LM1	6.9bc	1.9c	46cde	150b	242bcd	1.7a	C
LM2	7.5ab	1.8c	39ed	109bcd	272bcd	1.1b	CL
LM3	7.5ab	1.6c	79bc	127bc	283abcd	1.4ab	L
G1	6.9cb	1.9c	20d	14e	354a	1.8a	L
G2	7.7a	1.8c	37ed	18e	302ab	1.6ab	SL
G3	7.7a	6.3a	80bc	30e	230cd	1.5ab	SL
Sonora							
CH1	7.7a	2.0c	55bcde	52de	310ab	1.1b	SC
CH2	7.7a	3.8b	141a	66cde	242bcd	1.6ab	SC
CH3	7.7a	2.0c	75bcd	46de	353a	1.3ab	C
VY1	7.8a	2.1bc	75bcd	178ab	225d	1.8a	SCL
VY2	7.9a	1.6c	39ed	176ab	300abc	1.7a	SCL
VY3	7.9a	1.9c	89b	240a	270bcd	1.6ab	SL

EC= Electrical Conductivity; OM= Organic Matter; Texture: C= Clayey, CL= Clay Loam, L= loam, SL= Silty Loam, SC = Silty Clay, SCL= Silty Clay Loam. Means in the same column but with different letters are statistically different ($p \leq 0.05$)

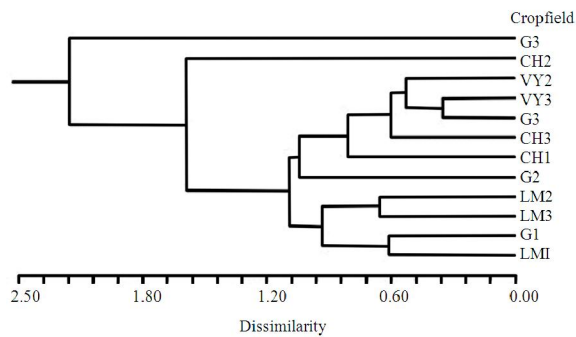


Fig. 3: Dendrogram of the physical and chemical soil properties

The principal components analysis applied to the soil properties returned salinity (45.8%) and texture (24.4%) as the variables with the greatest influence. In fact, the highest EC was observed for G3 (6.3 dS m⁻¹) followed by CH2 (3.8 dS m⁻¹) (Table 4), the two least similar fields among all those evaluated (Fig. 3).

On analyzing the dendrograms of the physical and chemical properties of the soil (Fig. 3) and the microscopic characteristics of FOC (Fig. 1), we can see that fields VY1, VY2, VY3, CH3 and CH1 tend to group into the same clade, suggesting that edaphological conditions and geographic origin have some kind of influence on the microscopic characteristics of this fungus.

Pathotypes detection by PCR: Of the 161 strains positive for FOC and based on the races reported for America (0, 1B/C, 1A, 5 and 6), the first two yellowing and the last three wilting with the exception of 1A, the four remaining pathotypes were identified by specific PCR (Fig. 4). Race was identified for 91 of the 161

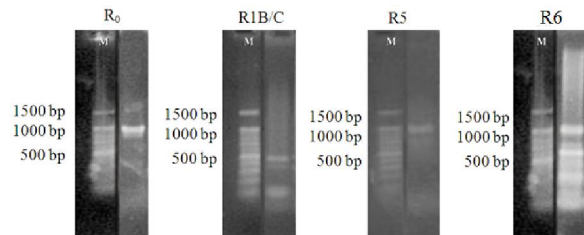


Fig. 4: Agarose gels showing amplification products from Polymerase Chain Reaction (PCR) using genomic DNA from isolates of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*. Size of amplified bands was: R0, 0.9 Kbp; R1B/C, 0.5 Kbp; R5, 0.9 Kbp and R6, 1.0 Kbp. M: 100 bp Ladder DNA marker

strains as follows: 0 (41%), 1B/C (15%), 5 (14%) and 6 (28%).

Thus, this is the first report of races of FOC in Mexico. The strains that did not fall into one of those previously mentioned have been stored for future study. These 70 remaining strains may belong to races previously not reported for the Americas, to new pathotypes or they may be nonpathogenic strains.

DISCUSSION

Isolation of FOC : Morales *et al.* (2004) observed the symptoms of the disease caused by FOC and even though they did not isolate the pathogen, they estimated that 60% of the area sown with garbanzo in La Costa de Hermosillo was affected by it. However, *Fusarium* wilt and root rot can be confused with diseases caused by other pathogens in the diagnosis if one bases the latter solely on the symptoms of the plant.

End time

Morphological variability of FOC: According to morphological variability of FOC, our results coincide with those obtained by Trujillo *et al.* (2005), who also detected a high degree of phenotypic and genomic variability in the strains of *Fusarium* spp. responsible for wilting in carnations. Morphological and genetic variability was also high in *Thanatephorus cucumeris* (A.B. Frank) Donk in vineyards of Sonora, Mexico (Meza-Moller *et al.*, 2007; Molina-Freaner *et al.*, 2010).

Fusarium oxysporum has been reported to vary in color on the PDA growth medium (Groenewald *et al.*, 2006). The aerial mycelium is white and can change to a variety of colors -from violet to dark purple- depending on the strain of *F. oxysporum*. Environmental conditions such as growth medium, light and temperature can cause pigment production in *F. oxysporum* (Rodrigues and Menezes, 2005).

The macro- and microscopic characteristics of the FOC strains this phenotypic variation coincides with that reported in other studies which identify *F. oxysporum* as one of the most variable species in its genus (Domsch *et al.*, 1993; Dueñas *et al.*, 2003; Groenewald *et al.*, 2006).

Microconidia size did not varied significantly, being similar to that recorded by Domsch *et al.* (1993). Chlamydoconidia size, for the eight groups was the same as that of the control, Martinez *et al.* (1996) observed that the number of *F. oxysporum* chlamydoconidia increases as the culture dehydrates, which points to their function as a resting spore.

Abiotic factors: The altitude of the chickpea growing region in northwestern Mexico is 12-75 m a.s.l. and the abiotic conditions that predominate are a dry to very dry climate, mean annual precipitation of 200 to 600 mm and a mean annual temperature of 23-25°C (INEGI, 2000). Ninety-eight percent of the area under cultivation and 92% of the world's chickpea production are in the semiarid tropics (Morales *et al.*, 2004). Vujanovic *et al.* (2006) recorded *F. oxysporum* in Canada at temperatures between -5.7 and -17°C and temperatures between 24 and 27°C, along with high soil and air humidity are ideal conditions for FOC. In contrast, in northwestern Mexico under conditions of extreme aridity, FOC are widely distributed.

Recently, Karami *et al.* (2009) reported the morphological characteristics and pathogenicity of *Synchytrium psophocarpis* (Rac.) Baumann associated with false rust on winged bean, but further investigations to elucidate the influence of environmental factors on the disease and to determine host range is required.

Morales *et al.* (2004) state that the occurrence of FOC increases in acid pH and it is suppressed by alkalinity. Our results suggest the adaptation of FOC to

neutral to slightly alkaline pH. Although the crop grows best at a pH of 6 (Singh and Diwakar, 1995), it can grow when pH is 2 to 12. The optimal pH for FOC is lower than 4.5 (Martinez *et al.*, 1996), though it has been isolated from soils at pH 5.3-6.3 (Vujanovic *et al.*, 2006). Morales *et al.* (2004) state that the occurrence of FOC increases in acid pH and it is suppressed by alkalinity. Our results suggest the adaptation of FOC to neutral to slightly alkaline pH. Anuar *et al.* (2008) reported long-term applications of N decreased the soil pH from 4.2 to 3.7, and caused leaching of K to the lower depth.

Electrical conductivity (EC), crops grow quite well when it is 1.5-2 dS m⁻¹, growth is average between 2.1 and 4 and poor when EC is above 4 dS m⁻¹ (Morales *et al.*, 2004). Chickpea's water requirement is low (40-45 cm surface water), with an EC lower than 1 dS m⁻¹ and a sodium absorption ratio of less than 5. Knowing the spatial losses of water beyond the root zone is important for precise management of the irrigation water (Aimrun *et al.*, 2010).

Vujanovic *et al.* (2006), observed a higher number of colony forming units (CFU g⁻¹ soil) of *F. oxysporum* colonies in sandy soils. Chickpea crops need deep soils with a sandy loam to clay loam texture and with no salinity problems (Kukreja *et al.*, 2005).

Pathotypes detection by PCR: Of the four FOC races, two yellowing and two wilting pathotypes were identified. Races of FOC are geographically circumscribed: 2, 3 and 4 have only been reported for India, while 0, 1B/C, 5 and 6, are known for the Mediterranean region and the United States of America (California). In contrast, race 1A is the most widely distributed and has been observed in all three of the aforementioned regions (Jimenez-Gasco *et al.*, 2004).

In Sonora and Sinaloa, though these states are significant producers and exporters of chickpea, the diagnosis of the disease is based on the symptomatology of the plants and on occasion plant yellowing and wilting is mistaken for root rot because the causal agent has not been isolated and identified. This means that studies are required to identify and understand the pathotypes, in order to contribute to the search for ways to control the disease.

In the Bajío region of Mexico, Luna-Paez *et al.* (2005) studied the distribution and genetic variability of FOC using genomic DNA polymorphisms and PCR-RAPD. However, they did not report the identity of the pathogenic races of FOC, just that there were two groups of isolates for yellowing and two for wilting, suggesting the possible presence of some of the races described for other countries.

The distribution and adaptation of the species in *Fusarium* are reported to be delimited by climate,

End time

geographic region, soil type, variety and cultivar (Vujanovic *et al.*, 2006).

CONCLUSION

Morphological variability in *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* was high in the main chickpea producing regions in northwestern Mexico and was not a function of the physical and chemical properties of the soil, nor of the geographic location of the cropfields. Yellowing (0 and 1B/C) and wilting (5 and 6) races were found among the strains isolated, reflecting the symptoms observed in the areas sampled. This is the first report of FOC races in Mexico. There may be other races or nonpathogenic strains of FOC in the study area, which would require specific primers to carry out PCR on the strains yet to be identified.

REFERENCES

- Aimrun, W., M.S.M. Amin and A. Gholizadeh, 2010. Spatial variability of irrigation water percolation rates and its relation to rice productivity. *Am. J. Applied Sci.*, 7: 51-55. DOI: 10.3844/2010.51.55
- Anuar, A.R., K.J. Goh, T.B. Heoh and O.H. Ahmed, 2008. Spatial variability of soil inorganic N in a mature oil palm plantation in Sabah, Malaysia. *Am. J. Applied Sci.*, 5: 1239-1246. DOI: 10.3844/2008.1239.1246
- Bhatti, M.A. and J.M. Kraft, 1992. Effects of inoculum density and temperature on root rot and wilt of chickpea. *Plant Dis.*, 76: 50-54. DOI: 10.1094/PD-76-0050
- Booth, C., 1975. Commonwealth mycological institute, ferry lane Kew, surrey, England. The present status of *Fusarium* Taxonomy. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 13: 83-93. DOI: 10.1146/annurev.py.13.090175.000503
- Burgess, L.W., B.A. Summerell, S. Bullock, K.P. Gott and D. Backhouse, 1994. Laboratory Manual for *Fusarium* Research. 3 Edn., Department of Crop Sciences, *Fusarium* Research Laboratory, University of Sydney and Royal Botanic Gardens, Australia, ISBN: 0867588497, pp: 124-133.
- Castellanos, J.Z., J.X. Uvalle and A. Aguilar, 2000. Soil and Water Analysis Interpretation Manual. 2 Edn., INCAPA, Mexico, 226 p.
- Di Pietro, A., F.I. Garcia-Maceira, E. Meglec and M.I. Roncero. 2001. A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis. *Mol. Microbiol.*, 39: 1140-1142. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2001.02307.x
- Domsch, K.H., W. Gams and T.H. Anderson, 1993. Compendium of Soil Fungi. Verlag, London, ISBN-10: 3980308383, 1264 p. www.nhbs.com/compendium_of_soil_fungi_2_volume_set_tefno_43983.html
- Dueñas, G.J.M., T. Shagarodsky, J.A. Fresneda, Y. Hernandez and J. Gonzalez, 2003. Characterization of *Fusarium* species associated with chickpea (*Cicer arietinum*) crops in Habana City provinces and La Habana. *Sci. Technol. Topics*, 11: 63-66. <http://www.utm.mx/~temas/temas-docs/nota4t32.pdf>
- Groenewald, S., N. Van Den Berg, W.F.O. Marasas and A. Viljoen, 2006. Biological, physiological and pathogenic variation in a genetically homogenous population of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. *Australas. Plant Pathol.*, 35: 401-409. DOI: 10.1071/AP06041.
- Gupta, S., D. Chakraborti, R.K. Rangi, D. Basu and S. Das, 2009. A molecular insight into the early events of chickpea (*Cicer arietinum*) and *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* (Race 1) interaction through cDNA-AFLP analysis. *Phytopathology*, 99: 1245-1257. DOI:10.1094/PHYTO-99-11-1245
- Hintze, J., 2007. NCSS 2007. NCSS, LLC. Kaysville, Utah, USA. <http://www.ncss.com>
- INEGI., 2000. Geographic information systems and digital mapping (Sonora) Scale 1:1000000. National Institute of Statistics, Geography and Informatics of Mexico, CD. Mexico. <http://mapserver.inegi.org.mx/mgn2k>
- Jimenez-Gasco, M.M., J.A. Navas-Cortes and R.M. Jimenez-Diaz. 2004. The *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*/*Cicer arietinum* pathosystem: a case study of the evolution of plant-pathogenic fungi into races and pathotypes. *Int. Microbiol.*, 7: 95-104. <http://www.im.microbios.org/26june04/03%20JimGasco.pdf>
- Karami, A., Z.A.M. Ahmad and K. Sija, 2009. Morphological characteristics and pathogenicity of *Synchytrium psophocarp* (Rac.) Baumann associated with false rust on winged bean. *Am. J. Applied Sci.*, 6: 1876-1879. DOI: 10.3844/2009.1876.1879
- Kukreja, S., A.S. Nandwal, N. Kumar, S.K. Sharma and S.K. Sharma et al., 2005. Plant water status, H₂O₂ scavenging enzymes, ethylene evolution and membrane integrity of *Cicer arietinum* roots as affected by salinity. *Biol. Plantarum*, 49: 305-308. DOI: 10.1007/s10535-005-5308-4
- Landa, B.B., J. Navas-Cortes, M.M. Jimenez-Gasco, J. Katan and B. Retig et al., 2006. Temperature response of chickpea cultivars to races of *Fusarium*

End time

- oxysporum* f.sp. *ciceris*, causal agent of *Fusarium* wilt. Plant Dis., 90: 365-374. DOI: 10.1094/PD-90-0365
- Luna-Paez, A., H.V. Silva-Rojas, N. Marban-Mendoza and E. Valadez-Moctezuma, 2004. Genetic variability of *Fusarium oxysporum* Schelechtend.: Fr. f.sp. *ciceris* (Padwick) Matuo and K. Sato by PCR-RAPDs in the Bajío, Mexico. Rev. Mex. Fitopatol., 22: 44-51. <http://sociedadmexicanadefitopatologia.org/archivos/61222107.pdf>
- Manjarrez-Sandoval, P., J.R. Agramon-Rocha, R.A. Salinas-Perez and L. Gomez-Gomez, 2004. Reports. Technology in the production of chickpea. Fundación Produce Sinaloa A.C., Mexico, 14 p. http://www.fps.org.mx/divulgacion/images/stories/que_hacemos/publicaciones/test/Jornada%20de%20Transferencia%20de%20Tecnologia%20del%20Cultivo%20del%20Garbanzo.pdf
- Martinez, G.E., N. de Albarracin, A. Arcia, L. Subero and M. Albarracin, 1996. Basal rot of garlic caused by *Fusarium oxysporum*. Agron. Trop., 46: 265-273. http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_ci/Agronomia%20Tropical/at4603/arti/martinez_g.htm
- Meza-Moller, A., M. Esqueda, A. Gardea, M. Tiznado and G. Virgen-Calleros, 2007. Morphological variability, pathogenicity and susceptibility to fungicides of *Rhizoctonia solani* isolated from rhizosphere of *Vitis vinifera* var. *perlette seedless*. Rev. Mex. Mic., 24: 1-7. <http://revistamexicanademicologia.org/wp-content/uploads/2009/10/1.%20RMM-099%20FINAL-web.pdf>
- Molina-Freaner, F.E., T.A. Markow, E.J. Feiler, O.R. Rojas-Soto, A. Varela-Romero, A. Quijadas-Mascareñas, M. Esqueda and G. Yépiz-Plascencia, 2010. Genetic diversity of the biota. In: Sonora's biological diversity. Molina-Freaner, F.E. and T.R. van Devender (eds.). UNAM-CONABIO, Mexico, ISBN: 978-607-02-0427-2, pp: 97-128.
- Morales, J.A., L.J. Duron, G. Martinez, J.H. Nuñez and A.A. Fu, 2004. The White Chickpea Crop in Sonora. Technical Book No. 6. INIFAP-SAGARPA, Mexico, ISBN: 968-5580-58-8, pp: 272.
- Nelson, P.E., T.A. Toussoun and W.F.O. Marasas, 1983. *Fusarium* Species: An Illustrated Manual for Identification. University Park, Pennsylvania State University Press, Pennsylvania, ISBN: 978-0271003498, pp: 193.
- Padilla-Valenzuela, I., R.I. Valenzuela-Valenzuela, C.M. Armenta-Castro, R.A. Salinas-Perez and E. Sanchez-Sanchez, 2008. Agronomic behavior of chickpea genotypes in delayed sowing at the Mayo Valley, Sonora, Mexico. Rev. Fitotec. Mex., 31: 43-49. <http://redalyc.uaemex.mx/pdf/610/61031106.pdf>
- Rodrigues, A.A.C. and M. Menezes, 2005. Identification and pathogenic characterization of endophytic *Fusarium* species from cowpea seeds. Mycopathologia, 159: 79-85. DOI: 10.1007/s11046-004-7138-x
- SAS, 1994. SAS/STAT User's Guide, release 6.08 version. Statistical Analysis System Institute, Inc. Cary, USA., pp: 705. <http://www.sas.com/technologies/analytics/statistics/stat/index.html>
- Sharma, K.D. and F.J. Muehlbauer. 2007. *Fusarium* wilt of chickpea: physiological specialization, genetics of resistance and resistance gene tagging. Euphytica, 157: 1-14. DOI: 10.1007/s10681-007-9401-y.
- Singh, F. and B. Diwakar, 1995. Chickpea botany and production practices. Skill development series No. 16. ICRISAT. Patancheru 502 324 andhra Pradesh, India, pp: 57. <http://test1.icrisat.org/Training/sds.16.pdf>
- Trujillo, E., B. Moreno, R. Acevedo and R. Vera, 2005. Genetic variability of *Fusarium* spp. causing of the vascular wilt in carnation by electrophoresis. Fitopatol. Venez., 18: 9-14. <http://avepagro.org.ve/fitopato/v181/18-1-002.pdf>
- Vujanovic, V., C. Hamel, E. Yergeau and M. St-Arnaud. 2006. Biodiversity and biogeography of *Fusarium* species from northeastern North American asparagus fields based on microbiological and molecular approaches. Microbial. Ecol., 51: 242-255. DOI: 10.1007/s00248-005-0046-x
- Walker, J.C., 1971. *Fusarium* wilt of tomato. Monograph 6. Am. Phytopathol. Soc., 56.

Capítulo II

Evaluación de líneas promisorias de garbanzo frente a marchitez por *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*

Rosa Marina Arvayo-Ortiz, Martín Esqueda, Evelia Acedo-Félix, Humberto González-Ríos y Georgina Vargas-Rosales

Enviado a la Revista Mexicana de Micología

Evaluación de líneas promisorias de garbanzo frente a marchitez por

Fusarium oxysporum f.sp. *ciceris*

Rosa Marina Arvayo-Ortiz¹, Martín Esqueda^{1*}, Evelia Acedo-Félix¹,

Humberto González-Ríos¹ y Georgina Vargas-Rosales¹

¹Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Apartado postal 1735, 83000 Hermosillo, Sonora, México.

Resumen: Con la finalidad de evaluar la resistencia de líneas promisorias de garbanzo: Hoga-012, Hoga-490-2 y Hoga-508, incluyendo los dos cultivares comerciales más importantes en México: Blanco Sinaloa-92 y Costa-2004, y como control dos cultivares: JG-62 (susceptible) y WR-315 (resistente), se realizó un ensayo de patogenicidad con las razas 0 y 5 de *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* (FOC). Todas las plantas se evaluaron con base en el daño foliar y radicular durante 50 días, utilizando una escala hedónica de cinco niveles (0-4). Las líneas nuevas de garbanzo así como los cultivares comerciales fueron susceptibles a las razas 0 y 5 de FOC. Se observaron cambios ($P < 0.05$) en la marchitez por efecto de los factores principales y sus interacciones dobles. El cultivar JG-62 mostró susceptibilidad a todas las razas, mientras que WR-315 fue resistente. En todos los tratamientos se comprobó que la marchitez fue causada por las razas de FOC. Por lo que se debe continuar en la búsqueda de genotipos resistentes a través de programas de mejoramiento para coadyuvar en el control de la enfermedad.

Palabras clave: Razas de FOC, fusariosis vascular, patogenicidad, genotipos resistentes.

Autor para correspondencia: *Martín Esqueda esqueda@ciad.mx*

**Evaluation of promising chickpea lines against wilt *Fusarium oxysporum* f.sp.
*ciceris***

Rosa Marina Arvayo-Ortiz¹, Martín Esqueda^{1*}, Evelia Acedo-Félix¹,
Humberto González-Ríos¹ y Georgina Vargas-Rosales¹

¹Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Apartado postal 1735,
83000 Hermosillo, Sonora, México.

Abstract: In order to evaluate the resistance of promising lines of chickpea: Hoga-012, Hoga-490-2 and Hoga-508, including the two most important commercial cultivars in Mexico: Blanco Sinaloa-92 and Costa-2004, and two control cultivars: JG-62 (susceptible) and WR-315 (resistant), a pathogenicity test was conducted with races 0 and 5 of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* (FOC). All plants were assessed based on leaf and root damage during 50 days, using a hedonic scale of five levels (0-4). New chickpea lines and commercial cultivars were susceptible to races 0 and 5 of FOC. FOC wilt changed due to main factors and their double interactions ($P < 0.05$). Cultivar JG-62 showed susceptibility to all races, while WR-315 was resistant. In all treatments, wilt was caused by FOC races. Therefore, research through breeding programs must continue in order to identify resistant genotypes that assist in controlling this disease.

Key words: Races of FOC, Fusarium wilt, pathogenicity, resistant genotypes

Corresponding author: *Martín Esqueda* esqueda@ciad.mx

Introducción

El cultivo de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) es afectado por enfermedades como la marchitez o fusariosis vascular producida por *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* Matuo & K. Sato (FOC) con pérdidas importantes en la producción. En Sonora, México, se registran pérdidas del 60 % (Morales *et al.*, 2004), mientras que en España del 12 al 15 % anual (Landa *et al.*, 2004). El manejo de la enfermedad es complejo y el uso de cultivares resistentes parece la medida de control más práctica y económicamente eficiente (Jiménez-Díaz *et al.*, 1991). Sin embargo, la resistencia de la planta ante el patógeno varía regionalmente y por ello, las variedades mejoradas se evalúan a través de múltiples ensayos. Así mismo el conocimiento sobre el comportamiento de las poblaciones del patógeno es esencial para diseñar un programa de mejoramiento efectivo y reducir las altas pérdidas ocasionadas por esta enfermedad (Sivaramakrishnan *et al.*, 2002).

Se han desarrollado líneas de garbanzo tipo “Kabuli” de alto rendimiento y con resistencia parcial o completa al marchitamiento por *Fusarium oxysporum* Schltdl. y *Didymella rabiei* (Kovatsch.) Arx (Navas-Cortés *et al.*, 1998). Sin embargo, la eficacia de la resistencia a la fusariosis vascular puede estar limitada por la aparición de razas patogénicas, las cuales difieren en patogenicidad y virulencia (Jiménez-Gasco *et al.*, 2005). Actualmente se han identificado ocho razas: 0, 1A, 1B/C, 2, 3, 4, 5 y 6 (Jiménez-Gasco y Jiménez-Díaz, 2003). Las razas 0, 1A, 1B/C, 5 y 6 se han registrado en España y California, Estados Unidos, mientras que las razas 2, 3 y 4 en la India, siendo estas tres últimas las más virulentas (Haware y Nene, 1982; Jiménez-Díaz *et al.*, 1994; Halila y Strange, 1996).

La raza 0 es la menos virulenta y la raza 1B/C induce amarillamiento foliar progresivo en comparación con el marchitamiento severo de las razas 1A a la 6. Así mismo se ha observado que las razas 0 y 1B/C son diferencialmente patogénicas en el cultivar JG 62, a pesar de que comparten el mismo patotipo, mientras que las razas 1B/C y 1A, que pertenecen a diferentes patotipos son moderada o altamente virulentas sobre el cultivar C104 (Jiménez-Gasco *et al.*, 2004). El patotipo de amarillamiento de FOC es menos virulento que el de marchitez, pero también pueden existir diferencias en virulencia entre razas de un mismo patotipo (Jiménez-Gasco *et al.*, 2005).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la resistencia de líneas promisorias de garbanzo mejoradas genéticamente con las razas 0 y 5 de *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*, aisladas en campos garbanceros de La Costa de Hermosillo y Valle del Yaqui, Sonora.

Materiales y Métodos

Preparación de inóculos

Los inóculos se prepararon a partir de seis cepas (C1...C6) procedentes de las regiones garbanceras más importantes de Sonora: La Costa de Hermosillo y Valle del Yaqui (Cuadro 1). Tres cepas pertenecían a la raza 0 (patotipo de amarillamiento) y tres a la raza 5 (patotipo de marchitez) de *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*. Las cepas se identificaron previamente por PCR-específica, utilizando oligonucleótidos específicos para esas razas. Los inóculos se multiplicaron en 50 mL de caldo dextrosa-papa, en un agitador orbital a 120 rpm y 25 ° C por 7-10 días, con luz fluorescente por 12 h.

El cultivo líquido se filtró a través de una doble capa de gasa estéril. Las suspensiones de conidias se midieron con un hemacitómetro y se ajustaron a una

concentración de 4×10^6 esporas mL^{-1} . Los inóculos se incrementaron en una mezcla de arena y harina de maíz (9:1, p/p), doblemente esterilizada durante 1 h a 121°C , se mezclaron homogéneamente e incubaron por 15 días a 25°C con 33 % de humedad relativa y luz fluorescente constante.

Líneas de garbanzo e inoculación

Las líneas promisorias se obtuvieron por mejoramiento genético mediante hibridación de cruza simples, retrocruzas y cruza múltiples entre genotipos de garbanzos porqueros tipo “Desi” con variedades comerciales tipo “Kabuli”, las cuáles fueron proporcionadas por INIFAP. Las semillas de garbanzo de L1 = Blanco Sinaloa-92 (cultivar comercial), L2 = Costa-2004 (cultivar comercial), L3 = Hoga-012 (línea promisorio), L4 = Hoga-490-2 (línea promisorio), L5 = Hoga-508 (línea promisorio), L6 = JG-62 (cultivar susceptible, control negativo) y L7 = WR-315 (cultivar resistente, control positivo), se pregerminaron en charolas con arena doblemente esterilizada por 1 h a 121°C . Los inóculos se colocaron en macetas de plástico de 1 L, que contenían tierra-arena-turba en la misma proporción y esterilizado dos veces por 1 h a 121°C y se mezclaron homogéneamente.

Las plantas pregerminadas por 4 días se transplantaron a las macetas inoculadas (tres plantas por maceta y tres macetas por tratamiento), y se colocaron en el suelo bajo condiciones naturales de luz y oscuridad. Se evaluaron diariamente 441 plantas, con 9 plantas testigo por línea experimental, las cuales no fueron inoculadas con el patógeno. El riego inicial fue de 200 mL y a partir del segundo día se regó con 100 mL diariamente. Las temperaturas promedio durante el ensayo de patogenicidad fueron de 20 y 25°C en marzo y abril respectivamente (Weather Channel, 2010).

Evaluación de la enfermedad e identificación del agente causal

El avance de la enfermedad se evaluó cada 5 días entre los 10 y 50 días después de la inoculación. Se utilizó una escala hedónica de cinco niveles para evaluar la sintomatología en las plantas, donde: 0 = sin síntomas, 1 = clorosis leve, 2 = clorosis moderada, 3 = clorosis severa o marchitez y 4 = muerte de la planta, modificando ligeramente la escala de Cai *et al.* (2003). Al finalizar el ensayo y para comprobar el daño por el patógeno, las plantas se sacaron de las macetas, se lavaron con agua corriente, se secaron sobre toallas de papel y se observaron los daños en las hojas, base del tallo y raíz. Se hicieron cortes de la raíz y base del tallo de 1-2 cm, los cuales se colocaron en alcohol etílico al 50 % por 30 seg., hipoclorito de sodio al 2 % por 2 min., se lavaron dos veces con agua destilada estéril, se removió el exceso de agua, se colocaron 5 secciones en agar-dextrosa-papa (PDA), incubaron por 7 a 10 días a 25 ° C (Nelson *et al.*, 1983; Burgess *et al.*, 1994) y se observaron las características macro- y microscópicas de las colonias.

Análisis estadístico y diseño experimental

Para realizar el análisis estadístico de la marchitez, los resultados se ajustaron a un diseño experimental completamente al azar con un arreglo factorial para tres factores, siendo el factor A las líneas promisorias de garbanzo con 7 niveles, identificadas de L1 a L7; el factor B, las razas de FOC con 6 niveles (B1 a B6) y el factor C, tiempo de exposición al patógeno con 9 niveles, día 10 al 50 con intervalos de 5 días. Se realizó un análisis de varianza por el procedimiento de modelos lineales generales, ajustando un modelo que incluyó los efectos principales de los factores y sus interacciones dobles.

Los valores originales de la variable marchitez, por ser datos ordinales no presentaron normalidad, por lo que se probaron algunas transformaciones de la variable,

siendo el logaritmo natural (Log) lo que permitió obtener su ajuste a la normal por la prueba de Martínez-Igiewicz. Se estimaron significancias de los términos del modelo a un nivel de probabilidad de 0.05 en el error Tipo I y la comparación de medias se realizó por la prueba de rangos múltiples de Tukey. Se construyeron gráficas de la variable para las interacciones dobles que resultaron significativas. Todos los procedimientos estadísticos se realizaron en el paquete estadístico NCSS, 2001 (Hintze, 2000).

Resultados y Discusión

Respuesta de las líneas de garbanzo ante las razas 0 y 5 de FOC

La marchitez fue influenciada ($P < 0.05$) por las razas de FOC, la línea experimental y el tiempo de exposición, asimismo fueron significativas ($P < 0.05$) las interacciones dobles de los factores principales. Para la interacción línea por raza, se observó que las líneas L3, L4, L5, fueron susceptibles a las dos razas, siendo más severo el daño en L6, quien presentó un valor de marchitez de 4, mientras que la línea L7 fue la más resistente con un valor medio de marchitez de 1.5 a las razas 0 (R0) y 5 (R5) de FOC. La mayoría de las líneas fueron susceptibles ($P < 0.05$) a las razas 0 (R0) y 5 (R5) de FOC. Observándose que la L7 fue la más resistente y L6, la más susceptible (Figura 2). Se comprobó que R0 y R5 fueron la causa de la fusariosis vascular en las líneas de garbanzo y que el daño inició con amarillamiento, avanzando gradualmente hasta marchitez completa. Lo anterior coincidió con Jiménez-Gasco *et al.* (2001), quienes afirman que los cultivares moderadamente susceptibles a R5, desarrollan un amarillamiento foliar lento y progresivo, que se puede diferenciar del amarillamiento causado por la R0 en cultivares susceptibles.

La mayoría de los garbanzos “Kabuli” y “Desi” que se cultivan en la región Mediterránea y el subcontinente Indio respectivamente, son resistentes a la R0. Las razas 2, 3 y 4, son las más virulentas de las ocho razas descritas y se han identificado sólo en la India (Halila y Strange, 1996; Haware y Nene, 1982; Jiménez Díaz *et al.*, 1994). La R0 es la menos patogénica de todas las razas de FOC y ocasionalmente puede no ser patogénica en el cultivar JG-62 (Jiménez-Díaz y Trapero-Casas, 1985). En contraste a lo anterior, en nuestro estudio JG-62 fue susceptible a la R0 aislada de campos garbanceros de Sonora.

El tiempo de exposición al patógeno fue el factor más determinante en cuanto al daño por marchitez en la planta. Los síntomas iniciaron en el día 10 con amarillamiento en tres plantas de JG-62 con R0, presentando marchitez a los 20 días y muerte en el día 30. Sin embargo, las demás plantas de esta línea murieron hasta los 45 días. En las otras líneas (L1, L2, L3, L4 y L5), los síntomas mostraron amarillamiento en el día 15, cambiando a marchitez al transcurrir el tiempo de exposición a las razas del patógeno. La marchitez completa de las plantas se presentó a los días 45-50. El comportamiento de L2, L3 y L4 fue similar entre ellas. En cambio WR-315 (L7) fue la más resistente, sólo presentó daño ligero frente a R0 y R5. Lo anterior coincidió con Trapero-Casas (1983), quien observó que después de 40 días, todas las plantas mostraron síntomas en todas las combinaciones aislado-cultivar, excepto en WR-315.

Con respecto al tiempo de exposición de las líneas de garbanzo frente al patógeno, se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre todos los tiempos, lo que indica que a medida que transcurre el tiempo el daño es más severo y como consecuencia, la muerte de la planta (Figura 3). En cuanto a la virulencia entre las cepas

se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre la C6 (R5) y las demás cepas; así como entre C4 (R5) y las cepas restantes, con excepción de la C2 (R0), y entre la C1 (R5) y las C6 (R5), C2 (R0) y C4 (R5). Así, la C1 (R5) y C6 (R5) fueron las más patogénicas (Figuras 1 y 4). Por el contrario, no se observaron diferencias ($P > 0.05$) entre C3 y C5, ambas de la R0 (Figura 1).

En cuanto a las líneas de garbanzo se observaron diferencias ($P < 0.05$) entre L7 con respecto a las demás líneas, así como entre L1 y L6. No se registraron diferencias ($P > 0.05$) entre L2, L3, L4 y L5, lo que indica que las líneas de garbanzo más afectadas por FOC fueron la L6 y L1, mientras que L7 la menos dañada (Figuras 2 y 3). Entre las líneas promisorias, L4 fue menos afectada que el resto de las líneas (Figuras 2 y 3).

La interacción cepa x línea fue significativa ($P < 0.05$), siendo L6 la más susceptible y L7 la más resistente a las razas evaluadas de FOC (Figura 2). R5 induce marchitez rápida en cultivares susceptibles, siendo ocasionalmente no-patogénica sobre WR-315 (Jiménez-Gasco *et al.*, 2001). Aunque en menor grado, L7 se afectó también particularmente con C6 (R5) y C5 (R0), en cambio L6, fue muy susceptible a C3 (R0) y también a C6 (R5). Para L1 (BS-92), C1 (R5) fue la cepa más patogénica y la que menos daño causó, la C5 (R0).

Se esperaría que el mayor daño siempre ocurra por efecto de R5 de marchitez, lo cual no se observó en el presente estudio. Asimismo para L2, las cepas más patogénicas fueron C1 (R5) y C4 (R5) (Figuras 2 y 4), mientras que C2 (R0) y C3 (R0) las menos patogénicas. Para las líneas 3 y 5, las cepas más patogénicas fueron C1 (R5) y C6 (R5) (Figura 2), mientras que para L4, la cepa más patogénica fue C6 (R5) y la menos, C3 (R0). Los resultados indican que la cepa más patogénica para la mayoría de las líneas

promisorias fue C1 (R5), perteneciente al patotipo de marchitez. Sin embargo, C4 también de la raza 5, no mostró el mismo grado de virulencia en todas las líneas, lo cual puede deberse a que la respuesta de las líneas es diferente frente a una misma raza o por la variabilidad entre cepas.

Por otro lado, Navas-Cortés *et al.* (2000) observaron que las razas de FOC difieren en patogenicidad y virulencia, dependiendo de la susceptibilidad del cultivar. Otros factores que favorecen el desarrollo de FOC son la temperatura alta, la cantidad de inóculo y el exceso de agua en el suelo (Navas-Cortés *et al.*, 2000; Maya, 2002). En el presente estudio la temperatura osciló entre 20 y 25 ° C, mientras que la cantidad de inóculo inicial fue la misma tanto para razas de amarillamiento como de marchitez. Así, se asume que el daño en las plantas podría deberse a la susceptibilidad de las líneas ante las razas 0 y 5 de FOC de esta región geográfica.

Con respecto a la interacción cepa x tiempo (Figura 1), se observaron cambios ($P < 0.05$) importantes en la marchitez, las cepas más patogénicas para las líneas de garbanzo la C1 (R5), C3 (R0), C6 (R5), C2 (R0), C5 (R0) y C4 (R5) con marchitez 4, 3.7, 3.5, 3.3, 3.2 y 3.2 respectivamente. De acuerdo al grado de virulencia, las que afectaron más temprano a las plantas fueron la C6 y C3 seguido de la C1, C2, C5 y C4. En la interacción línea x tiempo de exposición (Figura 3), L6 en el tiempo 10, presentó diferencias ($P < 0.05$) con el resto de las líneas, siendo la más susceptible donde los síntomas iniciaron antes que en las otras líneas y un mayor grado de marchitez (Figuras 2 y 4). De las líneas promisorias, la línea menos susceptible fue la L4 (Hoga-490-2), la cual en el día 15 presentó diferencias ($P < 0.05$) sólo con L6. Así mismo, a los 20 días, L2

presentó diferencias ($P < 0.05$) con todas las líneas excepto con L7 y en el día 25, L7 mostró disimilitud con las otras líneas excepto con L1.

En cuanto a los tiempos de exposición de cada una de las líneas frente a R0 y R5, la L7 presentó diferencia ($P < 0.05$) con respecto a las demás líneas, siendo la más resistente. Las líneas 2, 3 y 5 mostraron comportamiento similar entre ellas, sin embargo todas fueron afectadas por las razas de FOC (Figuras 2 y 3). Contrariamente, L7 (WR-315) mostró más resistencia al patógeno, con un grado máximo de marchitez de 1 a 2 (Figuras 2 y 4). Sharma *et al.* (2005) investigaron la resistencia genética de esta línea de garbanzo ante las razas 1A, 2, 3, 4 y 5 de FOC y sugieren que la resistencia es monogénica. Todas las líneas se afectaron con cepas de R0 (amarillamiento) y R5 (marchitez) a excepción de L7 (WR-315), siendo resistente a R0 y R5, mientras que L6 (JG-62) muy susceptible a dichas razas (Figuras 2 y 4).

El comportamiento de las R0 y R5 de FOC en las líneas de garbanzo no fue disímil a lo esperado, debido a que R0 también provocó marchitez en algunas líneas específicamente JG-62 (L6) y de amarillamiento en otras. Resultados similares observaron Tekeoglu *et al.* (2000) y Kaiser *et al.* (1994) con R0, que provocó marchitez en lugar de amarillamiento foliar, similar a la inducida por R5 en *C. reticulatum* (PI 489777) y en líneas diferenciadoras susceptibles (RILs). *Cicer reticulatum* (guisante progenitor del garbanzo) presentó muerte de la planta dentro de los 30 días de inoculación con R0, mientras que ICC-4958 fue resistente.

Conclusión

Las líneas promisorias de garbanzo Hoga-012, Hoga-490-2 y Hoga-508, así como los cultivares comerciales Blanco Sinaloa-92 y Costa-2004, no mostraron resistencia ante

las razas 0 y 5 de *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*, aisladas en campos garbanceros de Sonora. Por lo que se deberá continuar en la búsqueda de genotipos resistentes a través de programas de mejoramiento para coadyuvar en el control de la enfermedad.

Agradecimientos

Por la colaboración técnica del M. en C. Aldo Hiram Gutiérrez Saldaña (CIAD). A INIFAP por proporcionar las semillas de garbanzo para el presente estudio.

Literatura citada

- Burgess, L.W., B.A. Summerell, S. Bullock, K.P. Gott, D. Backhouse, 1994. Laboratory Manual for *Fusarium* Research. University of Sydney - Royal Botanic Gardens, Sydney.
- Cai, G., L. Rosewich Gale, R.W. Schneider, H.C. Kistler, R.M. Davis, K.S. Elias, E.M. Miyao, 2003. Origin of race 3 of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* at a single site in California. *Phytopathology* 93:1014-1022.
- Halila, M.H., R.N. Strange, 1996. Identification of the causal agent of wilt of chickpea in Tunisia as *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri* race 0. *Phytopathologia Mediterranea* 35:67-74.
- Haware, M.P., Y.L. Nene, 1982. Races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri*. *Plant Disease* 66:809-810.
- Hintze, J. 2000. *NCSS 2001. NCSS, LLC. Kaysville, Utah.*

- Jiménez-Díaz, R.M., A. Trapero-Casas, 1985. Use of fungicide treatments and host resistance to control the wilt and root rot complex of chickpeas. *Plant Disease* 69:591-595.
- Jiménez-Díaz, R.M., A.R. Alcalá-Jiménez, 1994. La fusariosis vascular del garbanzo causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*. 15 años de investigación en España. *Investigación Agraria: Producción y Protección Vegetales*. Fuera de Serie 2:285-294.
- Jiménez-Díaz, R.M., K.B. Singh, A. Trapero-Casas, J.L. Trapero-Casas, 1991. Resistance in kabuli chickpeas to *Fusarium* wilt. *Plant Disease* 75:914-918.
- Jiménez-Gasco, M.M., E. Pérez-Artés, R.M. Jiménez-Díaz, 2001. Identification of pathogenic races 0, 1B/C, 5, and 6 of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* with random amplified polymorphic DNA (RAPD). *European Journal of Plant Pathology* 107:237-248.
- Jiménez-Gasco, M.M., J. Navas-Cortés, R.M. Jiménez-Díaz, 2004. The *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris/Cicer arietinum*: a case study of the evolution of plant-pathogenic fungi into races and pathotypes. *International Microbiology* 7:95-104.
- Jiménez-Gasco, M.M., J. Navas-Cortés, R.M. Jiménez-Díaz, 2005. Evolución de *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*, el agente de la Fusariosis vascular del garbanzo, en razas patogénicas y patotipos. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas* 31:59-69.
- Jiménez-Gasco, M.M., R.M. Jiménez-Díaz, 2003. Development of a specific polymerase chain reaction-based assay for the identification of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* and its pathogenic races 0, 1A, 5, and 6. *Phytopathology* 93:200-209.

- Kaiser W.J., A.R. Alcalá-Jiménez, A. Hervás-Vargas, J.L. Trapero-Casas, R.M. Jiménez-Díaz, 1994. Screening of Wild *Cicer* species for resistance to races 0 and 5 of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*. Plant Disease 78:962-967.
- Landa B.B., J.A. Navas-Cortés, R.M. Jiménez-Díaz, 2004 . Integrated management of fusarium wilt of chickpea with sowing date, host resistance, and biological control. Phytopathology 94:946-960.
- Maya, B.S.M., 2002. Influencia de factores bióticos y de los componentes del patosistema *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*/*Cicer arietinum* en el desarrollo de la fusariosis vascular del garbanzo. Tesis de Doctorado, Universidad de Córdoba, España.
- Morales, J.A., L.J. Durón, G. Martínez, J.H. Núñez, A.A. Fu, 2004. El cultivo de garbanzo blanco en Sonora. Libro técnico No. 6 INIFAP-SAGARPA, Hermosillo.
- Navas-Cortés J.A., A.R. Alcalá-Jiménez, B. Hau, R.M. Jiménez-Díaz, 2000. Influence of inoculum density of races 0 and 5 of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* on development of Fusarium wilt in chickpea cultivars. European Journal of Plant Pathology 106:135-146.
- Navas-Cortés, J.A., D. Rodríguez-Jurado, R.M. Jiménez-Díaz, 1998. Combined resistance against *Didymella rabiei* and races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* in kabuli chickpeas. In: Navas-Cortés, J.A., D. Rodríguez-Jurado, R.M. Jiménez-Díaz (eds.), 3rd European Conference on Grain Legumes. Opportunities for High Quality, Healthy and Added-Value Crops to Meet European Demands. European Association for Grain Legumes, Valladolid, España. pp. 124-125.

- Nelson, P.E., T.A. Toussoun, W.F.O. Marasas, 1983. *Fusarium* species: An illustration manual for identification. Pennsylvania State University Press, Pennsylvania.
- Sharma, K.D., W. Chen, F.J. Muehlbauer, 2005. Genetics of chickpea resistance to five races of *Fusarium* wilt and a concise set of race resistance differentials for *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*. Plant disease 89:385-390.
- Sivaramakrishnan, S., S. Kannan, S.D. Singh, 2002 . Genetic variability of *Fusarium* wilt pathogen isolates of chickpea (*Cicer arietinum* L.) assessed by molecular markers. Mycopathologia 155:171-178.
- Tekeoglu, M., A. Tullu, W.J. Kaiser, F.J. Muehlbauer, 2000. Inheritance and linkage of two genes that confer resistance to *Fusarium* wilt in chickpea. Crop Science 40:1247-1251.
- Trapero-Casas, A., 1983. Wilt and root rot of chickpea in the Guadalquivir valley: importance, distribution, etiology, epidemiology, and control. Tesis de Doctorado, Universidad de Córdoba, España.
- Trapero-Casas, A., R.M. Jiménez-Díaz, 1985. Fungal wilt and root rot diseases of chickpea in southern Spain. Phytopathology 75:1146-1151.
- Weather Channel, 2010. <http://espanol.weather.com/>. Última consulta 26 de octubre de 2010.

Tabla 1. Aislados y razas de *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* utilizadas en las pruebas de patogenicidad.

Número de Aislado y cepa	Raza	Campo garbancero de origen	Latitud Norte	Longitud Oeste
150 = C1	R5	Bloque 217, Valle del Yaqui	27°30'31.9"	110°10'56.8"
315 = C2	R0	Bloque 213, Valle del Yaqui	27°29'37.4"	110°09'26.9"
174 = C3	R0	Esperanza, La Costa de Hermosillo	28°47'40.9"	111°36'13.6"
324 = C4	R5	Block 215, Valle del Yaqui	27°29'22.3"	110°09'48.9"
500 = C5	R0	Santa Lucía, La Costa de Hermosillo	28°42'39.5"	111°33'20.6"
501 = C6	R5	Tinajita, La Costa de Hermosillo	28°45'52.5"	111°20'09.9"

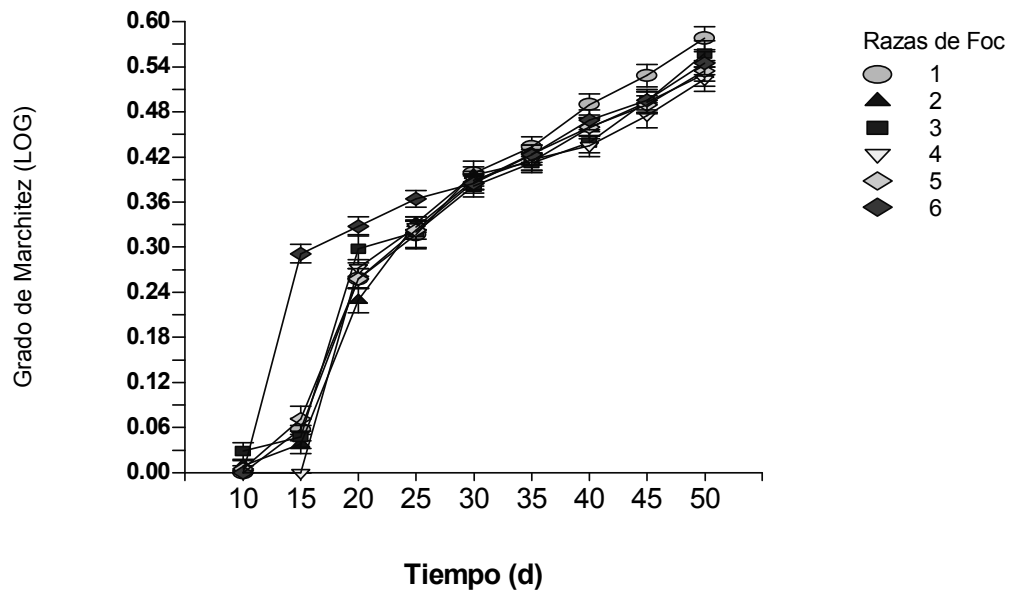


Figura 1. Cambios observados en la marchitez (media \pm error estándar de LOG de marchitez), debidos a la interacción cepa x tiempo. Razas de FOC: ○ C1 (R5), ▲ C2 (R0), ■ C3 (R0), ▽ C4 (R5), ◇ C5 (R0) y ◆ C6 (R5).

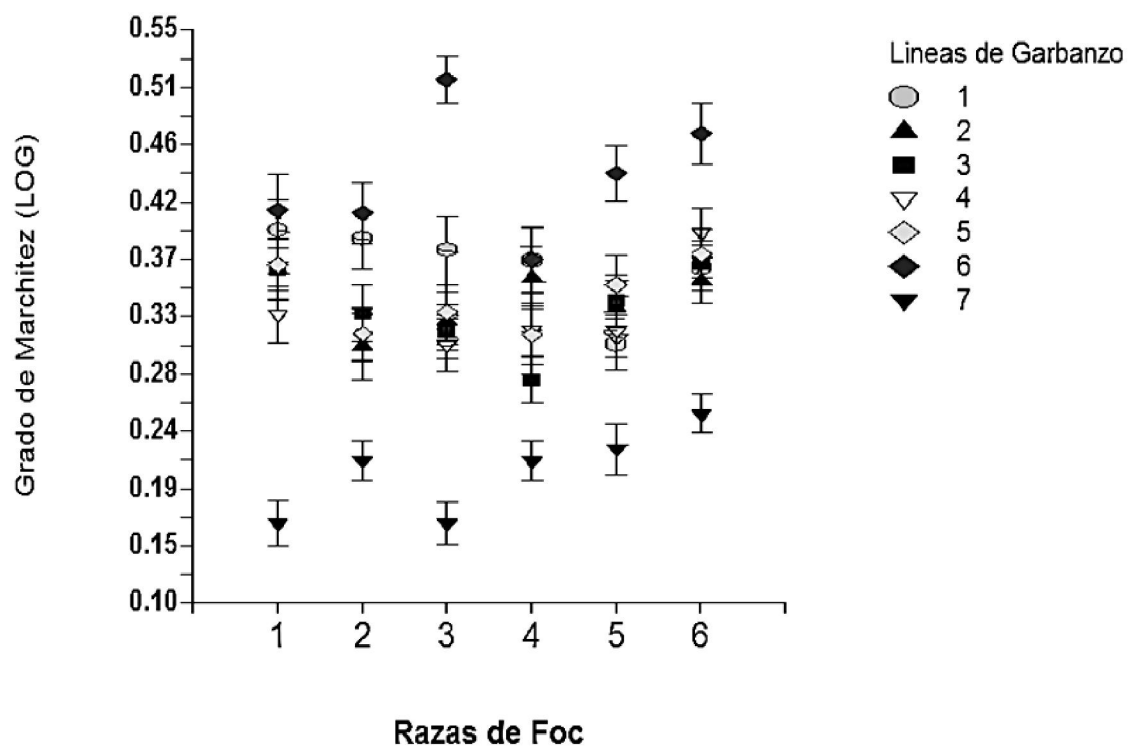


Figura 2. Valores medios \pm error estándar de LOG de marchitez para la interacción cepa x línea. Líneas de garbanzo: ○ L1 (BS-92), ▲ L2 (Costa-2004), ■ L3 (Hoga-012), ▽ L4 (Hoga-490-2), ◇ L5 (Hoga-508), ◆ L6 (JG-62) y ▼ L7 (WR-315).

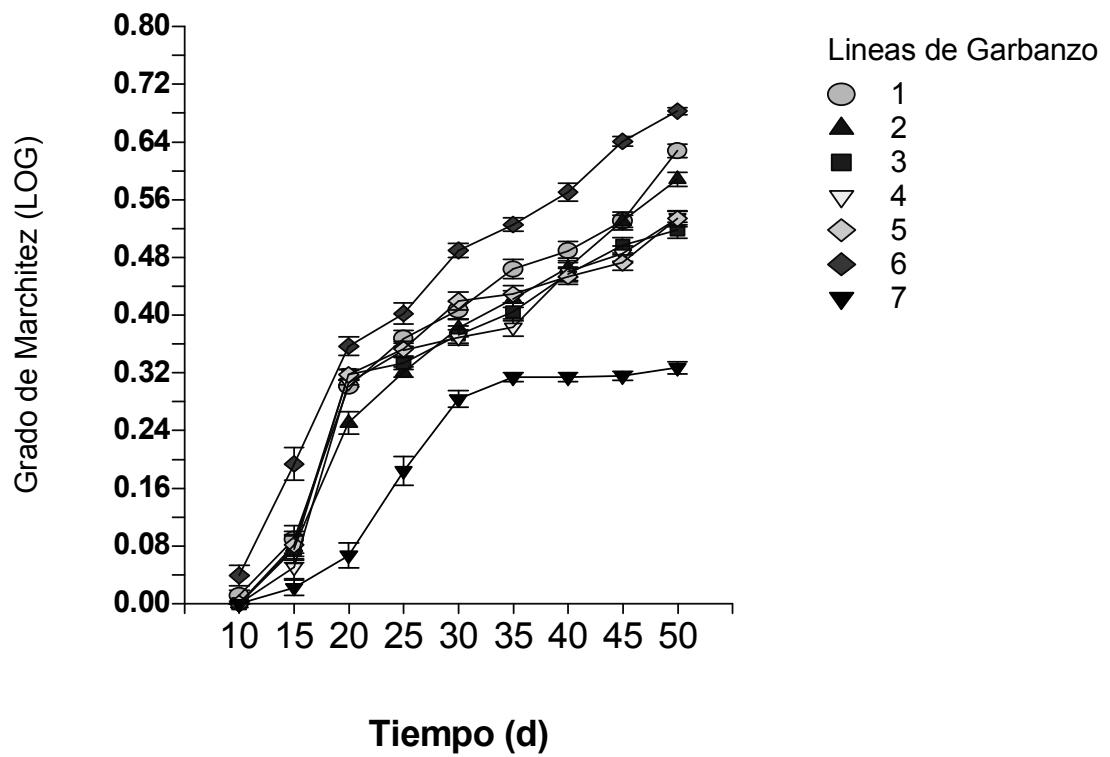


Figura 3. Comportamiento de la marchitez (media \pm error estándar de LOG de marchitez) a través del tiempo para cada línea experimental (interacción línea x tiempo). Líneas de garbanzo: \circ L1 (BS-92), \blacktriangle L2 (Costa-2004), \blacksquare L3 (Hoga-012), ∇ L4 (Hoga-490-2), \diamond L5 (Hoga-508), \blacklozenge L6 (JG-62) y \blacktriangledown L7 (WR-315).

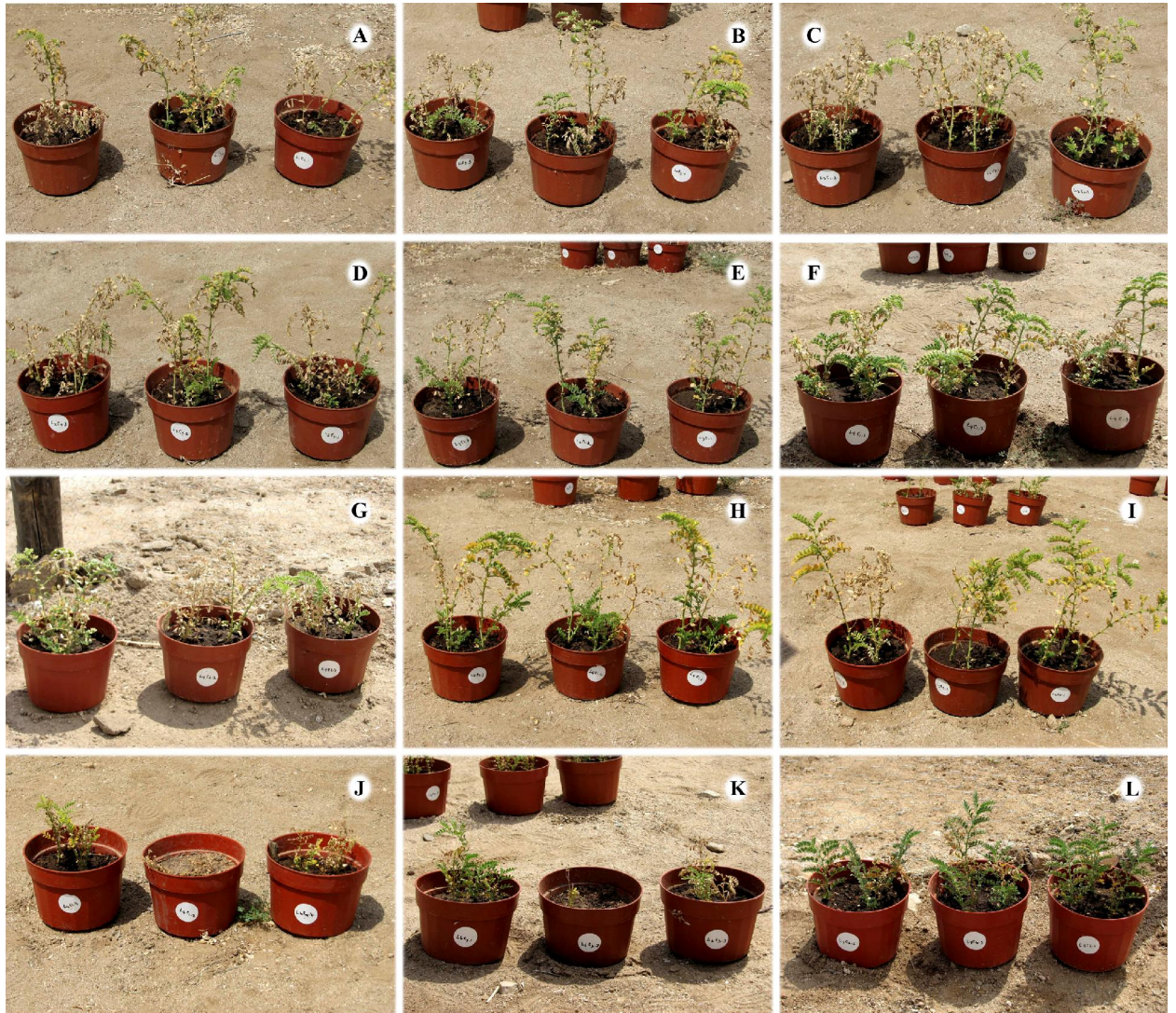


Figura 4. Comportamiento de líneas y cultivares de garbanzo a los 40 días frente a R0 y R5 de FOC aisladas en el noroeste de México. A y B: El cultivar BS-92 (L1) con marchitez por R5 (C1), además amarillamiento y marchitez por R0 (C3). C y D: Cultivar Costa-2004 (L2) con marchitez por R5 (C1 y C4). E: L3 (Hoga-012) con marchitez por R5 (C1). F y G: L4 (Hoga-490-2) menos susceptible a marchitez por R5 (C1), pero más susceptible a marchitez por R5 (C6). H e I: L5 (Hoga-508) con amarillamiento por R5 y R0 (C1 y C5). J y K: L6 (JG-62) muy susceptible a R5 y R0 (C1 y C3). L: L7 (WR-315) resistente a marchitez por R5 (C6).

CONCLUSIONES

En las regiones productoras de garbanzo blanco en el noroeste de México se presentó alta variabilidad morfológica en *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*, la cual no está determinada por la región geográfica de los campos de cultivo o las propiedades físicas y químicas del suelo. Los patotipos de amarillamiento (R0 y R1B/C) y de marchitez (R5 y R6) se encontraron entre los aislados de FOC, acorde a los síntomas observados en las áreas muestreadas. En el área de estudio pueden estar presentes otras razas de FOC o cepas de *Fusarium oxysporum* no patogénicas, para lo cual se requieren realizar pruebas de PCR con iniciadores específicos de las cepas aún no identificadas.

Las líneas promisorias de garbanzo Hoga-012, Hoga-490-2 y Hoga-508, así como los cultivares comerciales Blanco Sinaloa-92 y Costa-2004, no son resistentes a las razas 0 y 5 de *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*, aisladas en Sonora. Por lo que se deberá continuar en la búsqueda de genotipos resistentes a través de programas de mejoramiento para coadyuvar en el control de la enfermedad.

LITERATURA CITADA

- Bhatti, M.A., J.M. Kraft. 1992. Effects of inoculum density and temperature on root rot and wilt of chickpea. *Plant Dis.* 76: 50-54.
- Di Pietro, A., F.I. García-Maceira, E. Méglecz, M.I. Roncero. 2001. A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis. *Mol. Microbiol.* 39: 1140-1142.
- Dubey, S.C., S.R. Singh. 2008. Virulence analysis and oligonucleotide fingerprinting to detect diversity among Indian isolates of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* causing chickpea wilt. *Mycopathologia* 165: 389-406.
- Gurjar, G., M. Barve, A. Giri, V. Gupta. 2009. Identification of Indian pathogenic races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* with gene specific, ITS and random markers. *Mycologia* 101: 484-495.
- Gupta S., D. Chakraborti, R. Rangi, D. Basu, S. Das. 2009. A molecular insight into the early events of chickpea (*Cicer arietinum*) and *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* (race 1) interaction through cDNA-AFLP analysis. *Phytopathology* 99: 1245-1257.
- Halila, M.H., R.N. Strange. 1996. Identification of the causal agent of wilt of chickpea in Tunisia as *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri* race 0. *Phytopathologia Mediterranea* 35: 67-74.
- Haware, M.P., Y.L. Nene. 1982. Races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri*. *Plant Dis.* 66: 809-810.
- Haware, M.P., Y.L. Nene, M. Natarajan. 1996. Survival of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri*. *Plant Dis.* 66: 809-810.
- Honnareddy, N., S.C. Dubey. 2006. Pathogenic and molecular characterization of Indian isolates of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* causing chickpea wilt. *Curr. Sci.* 91: 661-666.
- Jiménez-Díaz, R.M., A.R. Alcalá-Jiménez, A. Hervás, J.L. Trapero-Casas. 1993. Pathogenic variability and host resistance in the *Fusarium oxysporum* f.sp.

- ciceris/Cicer arietinum* pathosystem. In: Jiménez-Díaz, R.M., A.R. Alcalá-Jiménez, A. Hervás, J.L. Trapero-Casas, 3rd. Proceeding European Seminars Fusarium Mycotoxins, Taxonomy, Pathogenicity and Host Resistance, Hodowla Róslin Aklimatyzacja i Nasiennictwo. Plant Breeding and Acclimatization Institute, Radzików, Poland. pp 87-94.
- Jiménez-Gasco, M.M. 2001. Caracterización molecular de razas patogénicas de *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* y análisis de su diversidad genética. Tesis de Doctorado. Universidad de Córdoba, Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, España.
- Jiménez-Gasco, M.M., E. Pérez-Artés, R.M. Jiménez-Díaz. 2001. Identification of pathogenic races 0, 1B/C, 5, and 6 of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* with random amplified polymorphic DNA (RAPD). Eur. J. Plant Pathol. 107: 237-248.
- Jiménez-Gasco, M.M., J.A. Navas-Cortés, R.M. Jiménez-Díaz. 2004. The *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris/Cicer arietinum* pathosystem: a case study of the evolution of plant-pathogenic fungi into races and pathotypes. Int. Microbiol. 7: 95-104.
- Jiménez-Gasco, M.M., J. Navas-Cortés, R.M. Jiménez-Díaz. 2005. Evolución de *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*, el agente de la Fusariosis vascular del garbanzo, en razas patogénicas y patotipos. Bol. San. Veg. Plagas 31: 59-69.
- Jiménez-Gasco, M.M., R.M. Jiménez-Díaz. 2003. Development of a specific polymerase chain reaction-based assay for the identification of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* and its pathogenic races 0, 1A, 5, and 6. Phytopathology 93: 200-209.
- Kelly, A., A.R. Alcalá-Jiménez, B.W. Bainbridge, J.B. Heale, E. Pérez-Artés, R.M. Jiménez-Díaz. 1994. Use of genetic fingerprinting and random amplified polymorphic DNA to characterize pathotypes of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* infecting chickpea. Phytopathology 84: 1293-1298.
- Landa, B.B., J. Navas-Cortés, M.M. Jiménez-Gasco, J. Katan, B. Retig, R.M. Jiménez-Díaz. 2006. Temperature response of chickpea cultivars to races of *Fusarium*

- oxysporum* f.sp. *ciceris*, causal agent of Fusarium wilt. Plant Dis. 90: 365-374.
- Luna-Páez, A., H.V. Silva-Rojas, N. Marbán-Mendoza, E. Valadez-Moctezuma. 2004. Variabilidad genética de *Fusarium oxysporum* Schelechtend.:Fr. f.sp. *ciceris* (Padwick) Matuo & K. Sato mediante PCR-RAPDs en el Bajío, México. Rev. Mex. Fitopatol. 22: 44-51.
- Manjarrez-Sandoval, P., J.R. Agramón-Rocha, R.A. Salinas-Pérez, L. Gómez-Gómez. 2004. Tecnología en la producción de garbanzo blanco para exportación. Fundación Produce Sinaloa, A.C., México. 14 p.
- Morales, J.A., L.J. Durón, G. Martínez, J.H. Núñez, A.A. Fu. 2004. El cultivo de garbanzo blanco en Sonora. Libro Técnico No. 6. INIFAP-SAGARPA, Hermosillo. 272 p.
- Navas-Cortés, J.A., D. Rodríguez-Jurado, R.M. Jiménez-Díaz. 1998. Combined resistance against *Didymella rabiei* and races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* in kabuli chickpeas. In: Navas-Cortés, J.A., D. Rodríguez-Jurado, R.M. Jiménez-Díaz (eds.), 3rd European Conference on Grain Legumes. Opportunities for High Quality, Healthy and Added-Value Crops to Meet European Demands. European Association for Grain Legumes, Valladolid, España. pp 124-125.
- Padilla-Valenzuela, I., R.I. Valenzuela-Valenzuela, C.M. Armenta-Castro, R.A. Salinas-Perez and E. Sanchez-Sanchez, 2008. Agronomic behavior of chickpea genotypes in delayed sowing at the Mayo Valley, Sonora, Mexico. Rev. Fitotec. Mex. 31: 43-49.
- Pérez-Artés, E., M.I.G. Roncero, R.M. Jiménez-Díaz. 1995. Restriction fragment length polymorphism analysis of the mitochondrial DNA of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*. J. Phytopathol. 143: 105-109.
- Saxena, M.C. 1990. Problems and potential of chickpea production in the nineties. In: Saxena, M.C. and K.B. Singh, Chickpea in the Nineties: Proceedings of the Second International Workshop on Chickpea Improvement ICRISAT, Patancheru, India. pp 13-27.

- Sharma, K.D., W. Chen, F.J. Muehlbauer. 2005. Genetics of chickpea resistance to five races of *Fusarium* wilt and a concise set of race resistance differentials for *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*. Plant Dis. 89: 385-390.
- Sharma, K.D., F.J. Muehlbauer. 2007. *Fusarium* wilt of chickpea: physiological specialization, genetics of resistance and resistance gene tagging. Euphytica 157: 1-14.
- Singh, K.B., B. Ocampo. 1997. Exploitation of wild Cicer species for yield improvement in chickpea. Theor. Appl. Genet. 95: 418-23.
- Sivaramakrishnan, S., S. Kannan, S.D. Singh. 2002 . Genetic variability of *Fusarium* wilt pathogen isolates of chickpea (*Cicer arietinum* L.) assessed by molecular markers. Mycopathologia 155: 171-178.
- Stevenson P.C., D.E. Padgham, M.P. Haware. 1995. Root exudates associated with the resistance of four chickpea cultivars (*Cicer arietinum*) to two races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri*. Plant Pathol. 44: 686-694.
- Trapero-Casas, A. 1983. Wilt and root rot of chickpea in the Guadalquivir valley: importance, distribution, etiology, epidemiology, and control. Tesis de Doctorado, Universidad de Córdoba, España.