



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GENÉTICA

EVALUACIÓN MORFOLÓGICA Y FISIOLÓGICA DE GENOTIPOS DE CLAVEL (*Dianthus caryophyllus L.*) INFESTADOS CON *Fusarium oxysporum*

JORGE PÉREZ CÁRCAMO

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO


2018

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION

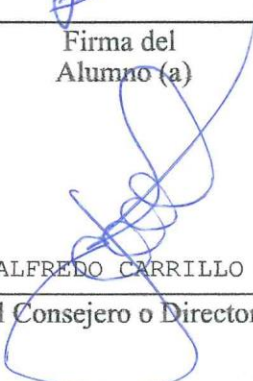
En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe JORGE PÉREZ CÁRCAMO, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor ^{DR. JOSÉ ALFREDO CARRILLO SALAZAR}, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis EVALUACIÓN MORFOLÓGICA Y FISIOLÓGICA DE GENOTIPOS DE CLAVEL (*Dianthus caryophyllus* L.) INFESTADOS CON *Fusarium oxysporum*

y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 8 de NOVIEMBRE de 2018



Firma del
Alumno (a)



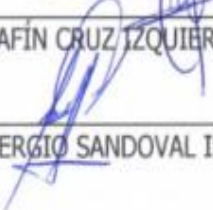


DR. JOSÉ ALFREDO CARRILLO SALAZAR
Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis titulada: **Evaluación morfológica y fisiológica de genotipos de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) infestados con *Fusarium oxysporum*** fue realizada por el alumno: **Jorge Pérez Cárcamo** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GENÉTICA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO	 DR. JOSÉ ALFREDO CARRILLO SALAZAR
ASESOR	 DR. SERAFÍN CRUZ IZQUIERDO
ASESOR	 DR. JOSÉ SERGIO SANDOVAL ISLAS

Montecillo, Texcoco, Estado de México, noviembre de 2018

Evaluación morfológica y fisiológica de genotipos de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) infestados con *Fusarium oxysporum*

Jorge Pérez Cárcamo, M. en C.

Colegio De Postgraduados, 2018.

RESUMEN

El clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) es una de las principales especies de flor de corte en el mundo pues junto con las rosas (*Rosa* sp.) y crisantemos (*Chrysanthemum* sp.) representan el 50 % del mercado mundial. En México se han generado 16 variedades de clavel de las cuales 80 % son susceptibles a *Fusarium oxysporum*, agente causal de “fusariosis o dormilona” que provoca las mayores pérdidas en este cultivo. El objetivo de esta investigación fue evaluar variables fisiológicas, severidad del daño tanto en el interior del tallo como en la parte aérea de la planta, número de plantas muertas y variables morfológicas de cuatro cultivares de clavel (Durcal, Bien fait, Brigette y Camile pink) inoculados con una cepa patogénica de *Fusarium oxysporum*, las cuales fueron evaluadas a los 75 días después del trasplante. *Fusarium oxysporum* causó menor biomasa seca de cada órgano de la planta ($\alpha = 0.05$) hasta en 65 %, así como menor longitud del tallo principal en 33 %, número de tallos en 33.5 %, número de entrenudos en 42 %, número de botones florales en 24.5 % y área foliar por planta en 44.5 %. En cambio, la biomasa seca de flores, el grosor de tallo y el número de flores no fueron afectados por la infestación del patógeno. El nivel de daño por la infestación del patógeno dependió del cultivar ($P < 0.05$). El cultivar más susceptible fue Camile pink (pétalos de flores de color blanco y con jaspeado de color rojo) que presentó un promedio de severidad del daño en la parte aérea de la planta de 3.62 (en una escala de 0 a 4), un promedio de severidad de daño al interior del tallo de 4.2 (en una escala de 0 a 5) y 75 % de plantas muertas, mientras el cultivar que presentó el mayor grado de resistencia fue Bien fait (flores de color anaranjado) ($\alpha = 0.05$).

Palabras clave: *Dianthus caryophyllus* L., *Fusarium oxysporum*, clavel, biomasa seca, severidad.

**Morphological and physiological evaluation of Carnation genotypes
(*Dianthus caryophyllus* L.) infested with *Fusarium oxysporum***

Jorge Pérez Cárcamo, M. en C.

Colegio De Postgraduados, 2018.

ABSTRACT

The carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) together with roses (*Rosa* sp.) and chrysanthemums (*Chrysanthemum* sp.) represent 50% of the worldwide market of cut flower species. In Mexico, 16 cultivars of carnation have been improved of which 80% are susceptible to *Fusarium oxysporum*, causal agent of "fusariosis" or "dormilona" that produces the largest losses in this crop. The objective of this investigation was to evaluate physiological and morphological variables, damage severity level from inside of the stem and from the aerial part of the plant, and plant mortality of four carnation cultivars (Durcal, Bien fait, Brigitte and Camile pink) inoculated with a pathogenic strain of *Fusarium oxysporum*, which were evaluated 75 days after the transplant. *Fusarium oxysporum* caused up to 65 % lower dry biomass of each organ of plant ($\alpha = 0.05$) and 33 % shorter main stem length. Also, the inoculated plants had lower number of stems in 33.5%, number of internodes in 42%, number of buttons florals in 24.5% and foliar area per plant in 44.5%. In contrast, dry biomass of flowers, stem thickness and number of flowers were not affected by the infestation of the pathogen. There were differences among cultivars in the damage level ($P < 0.05$). Camile pink (white petals with red variegation) was the most susceptible cultivar with an average damage severity level in the aerial part of the plant of 3.62 (on a scale of 0 to 4), an average damage severity level from inside of the stem of 4.2 (on a scale of 0 to 5), and 75% of mortality whereas Bien fait (orange flowers) was the cultivar with the highest degree of resistance ($\alpha = 0.05$).

Key words: *Dianthus caryophyllus* L., *Fusarium oxysporum*, carnation, dry biomass, damage severity level.

AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados, que hizo posible mis estudios de Postgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el financiamiento otorgado para la realización de esta investigación.

Al Programa de Genética, de Recursos Genéticos y Productividad (REGEP) del Colegio de Postgraduados, por la formación académica y el apoyo brindado para realizar mis estudios de maestría.

Al Dr. José Alfredo Carrillo Salazar, por su apoyo y paciencia, por compartir sus conocimientos y su valiosa dirección en la realización de esta investigación.

Al Dr. Serafín Cruz Izquierdo, por su apoyo y paciencia, y su valiosa colaboración en la realización del presente trabajo.

Al Dr. José Sergio Sandoval Islas, por compartir sus conocimientos y su importante participación en la realización de esta investigación.

A la Mc. Victoria Ayala Escobar, por sus acertadas sugerencias y apoyo en la realización de este trabajo.

A todas las personas que de alguna manera contribuyeron para la realización de este trabajo, especialmente a Luis Lugo Onofre Venegas, Luis Joel Galicia Caballero que siempre me mostró su apoyo incondicional hacer ameno el trabajo y a José Domingo Vivar Vivar, al Sr. José Alejandro Sánchez Valdez.

DEDICATORIA

A mis padres:

Samuel Pérez García y Irma Cárcamo Solimán. Con todo mi cariño y amor, por motivarme para alcanzar siempre mis metas.

A ti mamá: Por ser el ejemplo de una gran mujer, por tus consejos, comprensión y confianza, pero sobre todo por tu amor incondicional.

A ti papá: Por estar siempre a mi lado, por el apoyo brindado durante toda mi vida, pero sobre todo por tu amor incondicional.

A mis hermanos: Samuel Pérez Cárcamo, Damaris Pérez Cárcamo, Esther Pérez Cárcamo por su cariño, comprensión y apoyo, cada día.

A mis abuelas: Por todas sus enseñanzas, su sabiduría y ejemplos de perseverancia, por el amor que me brindan siempre.

A mis tíos (as) y primos (as): Porque siempre han estado apoyándome, y llenando mi vida de amor y alegría, porque de ustedes he aprendido infinidad de cosas, pues cada uno posee grandes virtudes.

A mis amigos (as): Por estos años de amistad y cariño, por motivarme a ser siempre una mejor persona, aunque la vida nos vaya poniendo en caminos diferentes, sé que siempre estarán a mi lado para apoyarme. Gracias por compartir los buenos y malos momentos durante este proceso de formación. Siempre contarán conmigo.

A mi Brother “Diego Vázquez Aguilar” y María Susana García Hernández por mostrarme su apoyo incondicional y motivarme, por esas pláticas eternas, que enriquecieron mi persona, así como mi conocimiento.

CON TODO MI CARIÑO LES DEDICO ESTA TESIS;

JORGE PÉREZ CÁRCAMO

CONTENIDO

RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE CUADROS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xv
I.INTRODUCCIÓN	1
1.3 Objetivo general.....	3
1.3.1 Objetivos específicos	3
1.4 Hipótesis	4
II.REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
2.1 Antecedentes	5
2.2 Importancia del clavel a nivel mundial y nacional	5
2.3 Condiciones para la producción de clavel.....	9
2.3.1 Necesidades de suelo	9
2.3.2 Luminosidad.....	10
2.3.3 Temperatura	10
2.4 Fecha de plantación.....	11
2.5 Aspectos generales del genero <i>Fusarium</i>	11
2.6 Aspectos biológicos y patológicos de la especie <i>Fusarium oxysporum</i>	12
2.7 Características y especificidad de plantas hospedantes de las formas especiales de <i>Fusarium oxysporum</i>	14
2.8 Sintomatología de la enfermedad causada por <i>Fusarium oxysporum</i>	15
2.9 <i>Fusarium oxysporum dianthi</i>	16

2.10	Identificación molecular de <i>Fusarium</i>	16
2.10.1	Marcadores moleculares.....	16
3.10.2	Reacción en cadena polimerasa (PCR)	17
III	MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.1	Sitio experimental.....	19
3.2	Obtención del inóculo de <i>Fusarium oxysporum</i>	19
3.2.1.	Muestreo.....	19
3.2.2.	Obtención, aislamiento e identificación de las cepas de hongos	19
3.2.3	Preservación de las cepas de hongos	21
3.3.	Prueba de patogenicidad.....	22
3.3.1.	Enraizamiento de esquejes de clavel.....	22
3.3.2	Manejo de cultivo	24
3.3.3	Preparación del inóculo	25
3.3.4	Inoculación	25
3.3.5	Diseño experimental para la prueba de patogenicidad	25
3.4	Respuesta de genotipos de clavel a la inoculación de ocho cepas identificadas.....	26
3.4.1	Material a utilizar.....	26
3.4.2	Manejo de cultivo	27
3.4.3	Preparación del inóculo	27
3.4.4	Inoculación de las plantas de clavel.....	27
3.4.4	Diseño experimental	28
3.5	Respuesta de genotipos de clavel a <i>Fusarium oxysporum</i>	29

3. 5.1 Material a utilizar.....	29
3.5.2 Manejo de cultivo	29
3.5.3 Preparación del inóculo	30
3.5.4 Inoculación de las plantas de clavel.....	30
3.5.5 Diseño experimental	30
3.8 Variables respuesta	31
3.8.1 Variables ambientales	31
3.8.2 Variables fisiológicas	32
3.8.3 Severidad de la infección	32
3.8.4 Variables morfológicas	33
3.9 Técnica molecular para la identificación de <i>Fusarium oxysporum</i>	34
3.9.1 Extracción de DNA en hongos mediante el método CTAB 2 % y acetato de sodio	34
3.9.2 Cuantificación de ADN (ng μL^{-1}).....	35
3.9.3 Amplificación por PCR de la región del espacio transcrito interno (ITS) del ADN ribosomal y el gen del factor de elongación de la traducción 1 α (TEF) para <i>Fusarium</i>	36
3.10 Análisis estadísticos	37
IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
4.1 Cepas aisladas de hongos	38
4.2 Prueba de patogenicidad.....	39
4.3 Respuesta de genotipos de clavel a la inoculación de las ocho cepas identificadas.....	46
3.5 Respuesta de genotipos de clavel a <i>Fusarium oxysporum</i>	59

3.6 Prueba molecular	72
V. CONCLUSIÓN.....	73
VI. BIBLIOGRAFÍA	74

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Densidad del inóculo / mL por solución de la cepa.....	28
Cuadro 2. Escala de severidad de la infección por <i>Fusarium oxysporum</i> en la parte externa de la planta de clavel. (Arbelaez y Calderón, 1991).	33
Cuadro 3. Escala de Severidad interna de daño al tallo de la planta de clavel provocado por <i>Fusarium oxysporum</i> (Núñez 1978).....	33
Cuadro 4. Lista de reactivos para la mezcla de PCR.....	36
Cuadro 5. Programa para termociclador para amplificación de ADN.	36
Cuadro 6. Cepas de hongos aisladas e identificadas de Tecolotepec, Coatepec de Harinas, Estado de México de acuerdo con la metodología descrita en el apartado 3.2.....	38
Cuadro 7. Promedios de las variables severidad en cultivares de clavel cultivadas en un invernadero en Montecillo, México, del 2 de enero al 9 de abril del 2018.....	42
Cuadro 8. Promedios de las variables severidad de las ocho cepas aisladas y un testigo en cultivares de clavel bajo condiciones de invernadero en Montecillo, México, del 2 de enero al 9 de abril del 2018.	43
Cuadro 9. Promedios de las variables severidad de los tratamientos en cultivares de clavel bajo condiciones de invernadero en Montecillo, México, del 2 de enero al 9 de abril del 2018.....	44
Cuadro 10. Promedio de la biomasa seca por órgano y variables fisiológicas en cultivares de clavel bajo condiciones de invernadero en Montecillo, México, del 1 de abril al 15 de mayo del 2018.....	51
Cuadro 11. Promedio de severidad y variables morfológicas en cultivares de clavel cultivadas en un invernadero en Montecillo, México, del 1 de abril al 15 de mayo del 2018.....	52

Cuadro 12. Promedio de biomasa seca por órgano vegetal y variables fisiológicas por la inoculación de plantas de clavel con ocho cepas de hongos, cultivadas bajo invernadero en Montecillo, México, del 1 de abril al 15 de mayo durante el 2018.....	53
Cuadro 13. Promedios de las variables de severidad y morfologías por la inoculación de plantas de clavel con ocho cepas de hongos, cultivadas bajo invernadero en Montecillo, México, del 1 de abril al 15 de mayo durante el 2018.	54
Cuadro 14. Promedio de biomasa seca por órgano vegetal y variables fisiológicas de los tratamientos en plantas de clavel, cultivadas bajo invernadero en Montecillo, México, del 1 de abril al 15 de mayo durante el 2018.	55
Cuadro 15. Promedios de las variables severidad y morfológicas de los tratamientos en plantas de clavel, cultivadas bajo invernadero en Montecillo, México, del 1 de abril al 15 de mayo durante el 2018.	57
Cuadro 16. Promedio de biomasa seca por órgano vegetal y variables fisiológicas por la inoculación de plantas de clavel con ocho cepas de hongos, cultivadas bajo invernadero en Montecillo, México, del 1 de abril al 15 de mayo durante el 2018.....	63
Cuadro 17. Promedios de las variables de severidad y morfológicas por la inoculación de plantas de clavel con ocho cepas de hongos, cultivadas bajo invernadero en Montecillo, México, del 1 de abril al 15 de mayo durante el 2018.	64
Cuadro 18. Promedio de biomasa seca por órgano vegetal y variables fisiológicas por dos inoculaciones en plantas de clavel, cultivadas bajo invernadero en Montecillo, México, del 1 de abril al 15 de mayo durante el 2018.	65

Cuadro 19. Promedios de las variables de severidad y morfologías por dos inoculaciones en plantas de clavel, cultivadas bajo invernadero en Montecillo, México, del 1 de abril al 15 de mayo durante el 2018.66

Cuadro 20. Promedio de biomasa seca por órgano vegetal y variables fisiológicas de los tratamientos en plantas de clavel, cultivadas bajo invernadero en Montecillo, México, del 1 de abril al 15 de mayo durante el 2018. 67

Cuadro 21. Promedios de las variables severidad y morfológicas de los tratamientos en plantas de clavel, cultivadas bajo invernadero en Montecillo, México, del 1 de abril al 15 de mayo durante el 2018.68

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Imágenes de hongos identificados a una resolución de 72 píxeles/pulgada de muestras de Tecolotepec, Coatepec de Harinas, Estado de México..... 39
- Figura 2. Temperatura mínima, media y máxima del aire de 130 ddt hasta el muestreo destructivo en tres cultivares de clavel en Motecillo, Texcoco, Estado de México de 9 de diciembre 2017 a 9 de abril 2018..... 40
- Figura 3. Humedad relativa mínima, media y máxima del aire de 130 ddt hasta el muestreo destructivo en tres cultivares de clavel en Motecillo, Texcoco, Estado de México de 9 de diciembre 2017 a 9 de abril 2018..... 40
- Figura 4. Temperatura del aire mínima, media y máxima a los 70 ddt hasta el muestreo destructivo en tres cultivares de clavel en Motecillo, Texcoco, Estado de México del 9 de diciembre 2017 al 9 de abril 2018..... 46
- Figura 5. Humedad relativa mínimas, máximas y promedio de los 70 ddt hasta el muestreo destructivo en tres cultivares de clavel en Motecillo, Texcoco, Estado de México del 9 de diciembre 2017 al 9 de abril 2018..... 47
- Figura 6. Temperaturas máximas, mínimas, y promedio de los 70 ddt hasta el muestreo destructivo en tres cultivares de clavel en Motecillo, Texcoco, Estado de México del 9 de diciembre 2017 al 9 de abril 2018..... 59
- Figura 7. Humedad relativa promedio de los 70 ddt hasta el muestreo destructivo en tres cultivares de clavel en Motecillo, Texcoco, Estado de México del 9 de diciembre 2017 al 9 de abril 2018..... 60

I.INTRODUCCIÓN

El clavel *Dianthus caryophyllus* L. pertenece a la familia de las Cariofiláceas, que reúne alrededor de 250 especies, y es una especie ornamental de interés mundial como flor de corte. Junto con sus características de belleza, posee cualidades que la hacen potencialmente apta para la comercialización, debido a que puede producir flores durante todo el año (Besermer, 1988). De acuerdo con el SIAP, la superficie total sembrada de clavel en México para 2015 fue de 440 ha. El Municipio de Villa Guerrero, Estado de México ocupa el primer lugar en superficie sembrada con 228 ha, mientras que el Municipio conurbado de Coatepec de Harinas, Estado de México, ocupa el segundo lugar con 206 ha. Solo estos dos municipios poseen casi el 96 % de la superficie total sembrada de clavel en el territorio nacional (SIAP, 2017). En menor proporción y dado el potencial y capacidad de adaptación, existen reportes de expansión del cultivo (Martínez 2008, Camacho *et al.*, 2014) en los estados de Morelos, Baja California y Puebla, donde también se produce flor de corte de clavel. El Gobierno Mexicano por su parte, ha promovido campañas de difusión para producir flor de clavel como una opción de desarrollo en los estados de Oaxaca, Sonora, Sinaloa, San Luis Potosí, Michoacán, Guanajuato, Guerrero y Aguascalientes (Linares, 2004).

Según la UPOV, se han otorgado 16 registros de variedades de clavel en México hasta el 2016, de la cuales 14 son del fitomejorador Hilverda Kooiji. Tres de estas 16 variedades son resistentes a *Fusarium oxysporum*, por lo que más del 80 % de las variedades mexicanas presentan susceptibilidad a *Fusarium oxysporum*, patógeno que, en las últimas décadas, representa un problema constante en la producción de diferentes cultivos, incluyendo al cultivo de clavel. Su incidencia desencadena en el hospedante una serie de afecciones, generalmente de carácter irreversible, originando pérdidas económicas

considerables (García *et al.*, 2007). La enfermedad causada por *Fusarium oxysporum* es conocida comúnmente como “fusariosis” o “dormilona”, y se ha reportado en Xochimilco, CDMX. (Lamas, 1978), Villa Guerrero, Estado de México (Espinoza, 1973; Núñez, 1978), Morelos (Martínez, 2008) y Baja California (Camacho *et al.*, 2014). El daño en clavel es constante en cada ciclo de producción, siendo el problema más grave en varias décadas para la producción de este cultivo (Núñez, 1978; Núñez, 1982; Lamas, 1978; Espinoza, 1973; Martínez, 2008; Camacho *et al.*, 2014).

Para el tratamiento de enfermedades causadas por *Fusarium*, se usan fungicidas sistémicos como los benzimidazoles, en donde se incluyen el benomil, carbendazim, tiabendazol, y tiofanato (Agrios, 2005). Sin embargo, es probable que estos fungicidas sean agentes mutagénicos para las plantas, y puedan incrementar el grado de resistencia de los patógenos (Agrios, 2005). Además, representan un riesgo severo para la salud humana y contribuyen al aumento de la contaminación al medioambiente (Abdel-Monahim *et al.*, 2011). Según FAO (2014), la agricultura tiene gran impacto en el medio ambiente; es la principal fuente de contaminación del agua por nitratos, fosfatos y plaguicidas. También es la mayor fuente antropogénica de gases responsables del efecto invernadero, metano y óxido nitroso, y contribuye en gran medida a otros tipos de contaminación del aire y del agua. Los métodos agrícolas, forestales y pesqueros y su alcance son las principales causas de la pérdida de biodiversidad del mundo. Para reducir este problema, existe la necesidad de buscar y adoptar estrategias que sean accesibles, amigables con el ambiente, sencillas de aplicar y no tóxicas para seres humanos y animales (Naeini *et al.*, 2010).

Existen diferentes formas de prevenir la enfermedad, desde control químico, biológico y resistencia genética. Si se usa esta última estrategia, es importante

sentar las bases del mejoramiento genético de clavel, para obtener eventualmente variedades nuevas con resistencia a *Fusarium oxysporum*.

En esta investigación, se evaluó la respuesta de cultivares comerciales de clavel a la infestación de *Fusarium oxysporum* cultivados en un invernadero bajo cubierta plástica blanco lechoso, ambiente usado comercialmente en las zonas productoras de clavel, pues se considera el ambiente propicio para obtener tallos florales de clavel de calidad comercial, manteniendo condiciones de humedad relativa que favorecen el desarrollo de la marchitez del clavel causada por *Fusarium oxysporum*, (Tramier *et al.* 1983; Puhalla *et al.*, 1989). Considerando que las variedades mejoradas genéticamente, en el país, en su mayoría poseen alta susceptibilidad a *Fusarium oxysporum*.

1.3 Objetivo general

Determinar los cultivares de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) con mayor resistencia a la infestación de *Fusarium oxysporum*, así como evaluar la respuesta de genotipos a diversos hongos.

1.3.1 Objetivos específicos

- Aislar e Identificar cepas de hongos presentes en plantas de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.).
- Determinar la cepa con mayor patogenicidad en cultivares de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.).
- Evaluar morfológicamente y fisiológicamente la respuesta de los cultivares de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) infestados con las cepas de hongos aisladas.
- Evaluar morfológicamente y fisiológicamente la respuesta de los cultivares de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) infestados con *Fusarium oxysporum*.

1.4 Hipótesis

- *Fusarium oxysporum* se encuentra presente en la región florícola más importante del país.
- El hongo que causa mayor daño es *Fusarium oxysporum*.
- Hay variedades de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) que presentan mayor resistencia a la infestación de diversos hongos fitopatógenos.
- Existen genotipos de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) que poseen mayor resistencia a la infestación de *Fusarium oxysporum*.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Antecedentes

El clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) ha sido cultivado desde hace 2000 años aproximadamente, “**Dianthus**” traducido del griego significa “flor divina” debido a su hermosa fragancia. Su nombre común puede que se derive de “coronación”, ya que los griegos tejían flores de *Dianthus* en coronas de sus atletas (Besemer, 1988).

El clavel es originario de mediterráneo. Las especies nativas florecían solo en primavera debido a la variación del fotoperiodo y temperatura. Su mejoramiento empezó en el siglo XVI. Su cultivo fue introducido a América en 1852. Desde entonces muchas empresas han desarrollado cientos de cultivares para la producción de flor de corte a nivel comercial. Las más importantes fueron producidas por William Sim en el año 1938, 1939, siendo la mayor contribución a la industria (Besemer, 1988).

Si bien la planta silvestre cuenta con pétalos de color violeta, de este material se obtuvieron mutaciones para obtener pétalos de color rojo, blanco, rosa, naranja y varias formas jaspeadas. El clavel moderno tiene muy poco parecido al ancestro, ya que ahora florecen durante todo el año, tiene tallos fuertes y largos, flores mucho más grandes y compuestas, y una gran diversidad de colores (Besemer, 1988).

2.2 Importancia del clavel a nivel mundial y nacional

Según la CBI, los claveles tienen un valor simbólico en muchos países. El clavel es considerado como la flor nacional de España, especialmente en el sur, en donde se le asocia con la pasión y el deseo. Los claveles rojos (junto con las

rosas rojas) están asociados con el Día Internacional del Trabajo (1 de mayo) y con el movimiento obrero en general. Los claveles púrpuras se utilizan a menudo como flores funerarias en Francia. Los claveles blancos se consideran un símbolo del amor en algunos países y los claveles también expresan símbolo de la dedicación.

Los consumidores de algunos países europeos consideran a los claveles como una flor bastante anticuada; se asocian con ramos florales baratos en el mercado. Sin embargo, la imagen de los claveles está mejorando gracias a los esfuerzos combinados de fitomejoradores, cultivadores y campañas de promoción. Los fitomejoradores han introducido variedades nuevas con matices de moda. Los claveles se utilizan como rellenos de ramos, pero también se aprecian solos; se valoran por su larga vida de florero y una amplia variedad de colores y apariencias. En la mayoría de los países europeos las flores cortadas se venden a través de las tiendas de flores. Solo en el Reino Unido se encuentra la mayoría de las flores vendidas a través de supermercados minoristas. En Polonia, cerca de 75 % de las flores cortadas se venden en las tiendas de flores, aunque el canal de supermercados está ganando terreno rápidamente. Los supermercados tienen una participación superior a la media en las ventas de claveles, en casi todos los países de la UE (Unión Europea).

Las importaciones de claveles cortados en la UE aumentaron ligeramente entre 2011 y 2015. El valor total de las importaciones fue de 211 millones de euros en 2015. Los claveles representan entre un 5 % y un 6 % del total de importaciones de flores cortadas en la UE. En 2015, unos 880 millones de tallos fueron importados de países en desarrollo, algo menos que un año antes. El principal importador europeo son Países Bajos que representa el 30 % de todas las importaciones de los distintos países de la UE, incluido el comercio (CBI 2015).

El mayor exportador de los países en desarrollo es Colombia, que exportó claveles cortados con un valor de 67 millones de euros a la UE en 2015. La mayor parte se exporta directamente a los Países Bajos (39 millones de euros) y alrededor 13 millones de euros se exportan al Reino Unido. Turquía y Kenia exportaron 21 millones de euros y 16 millones de euros, respectivamente. De este 36 % se exporta al Reino Unido y cerca del 12 % se exporta a los Países Bajos. Las exportaciones de Etiopía y Marruecos también han mostrado un aumento significativo en los últimos años. Dentro de Europa, España y los Países Bajos, así como algunos otros países producen algunos claveles. Sin embargo, la superficie de producción y el número de productores se reducen rápidamente a medida que crece la competencia de los países en desarrollo. Los claveles cortados exportados a la UE deben cumplir la legislación comunitaria en materia fitosanitaria. La UE ha establecido requisitos fitosanitarios para prevenir la introducción y propagación de organismos nocivos para plantas y productos vegetales en la UE (CBI 2015).

Los claveles importados en la UE deben ir acompañados de un «certificado fitosanitario» oficial que garantice las condiciones fitosanitarias de los vegetales y productos vegetales y que el envío ha sido oficialmente inspeccionado, cumple los requisitos legales para entrar en la UE y está exento de plagas cuarentenarias Y otros patógenos dañinos. Los certificados fitosanitarios son expedidos por su National Plant Protection Office (NPPO).

Información publicada el 31 de julio 2016 por la (BBC, 2016) que el valor estimado a nivel mundial de las flores de corte es de más de 100,000 millones de dólares al año. Y es una industria en la que varios países latinoamericanos están conquistando terreno, notablemente Colombia, que es el mayor productor después del líder histórico, Holanda en el cual se encuentra el mercado más grande de flores, que según la BBC se trata de un vasto complejo del tamaño de

Mónaco, al que llegan billones de flores de todo el mundo y por las que los compradores batallan en lo que se conoce como "el Wall Street de las flores". El mercado tiene 155 km² de superficie en total. Está dividido en tres enormes mercados: Aalsmeer, Naaldwijk y Rijnsburg. Aalsmeer cubre 1,000,000 m², lo que lo hace la estructura comercial más grande del planeta en términos de superficie ocupada. Cada 24 horas recibe alrededor de 30 millones de flores de todo el mundo, que deben ser vendidas en las 4 horas que duran las 7 subastas que empiezan a las 06:00 a.m.

En un día muy activo, como el Día de la Madre, se realizan más de 100,000 transacciones en esas 4 h. En Aalsmeer en no más de 2.5 h todos los compradores tienen que haber recibido sus flores. El mercado de flores en Estados Unidos es el tercer mercado más importante a nivel mundial; los principales mercados son Holanda y Japón. Otro mercado importante es Alemania, seguido de Italia, Francia, Reino Unido, Suiza, España, Austria, Suecia y Finlandia, y Bélgica (CBI, 2015).

En los Estados Unidos, los ornamentales son muy demandados. Según la USDA (2012), las rosas lideran las flores más importadas con 367.3 millones de dólares, crisantemos con 128.9 millones de dólares, y claveles con 85.2 millones de dólares. En todos estos casos los proveedores del mercado americano en estas flores son Colombia, y Ecuador. Las importaciones en el 2012 alcanzaron la suma de 615.7 millones de dólares; su principal proveedor fue Colombia quien le vendió 480.1 millones de dólares seguido de Ecuador. México solo aportó 2 % de las importaciones de este país. El mercado Americano de Floricultura en el 2012 fue de 27.8 billones en el Mercado Retail en floricultura, están incluidas las flores frescas cortadas, masetas con flores y plantas (US. Bureau of Economics, 2012). Los principales productores de flores en el mundo

son: China, Ecuador Colombia, México, Kenia y exportadores son Holanda, Kenia, Etiopia, Ecuador Colombia y Bélgica.

En México según SIAP 2013 a nivel nacional se cultivaron 23,088 ha de ornamentales con un valor en la producción de seis mil 337 millones de pesos, en la que participaron cerca de 25,500 productores. El mercado ornamental genera 188 mil empleos permanentes y 50 mil eventuales y más de un millón indirectos, la mayoría se encuentran en los estados de México, Ciudad de México, Puebla, Morelos y Veracruz, regiones que concentran el 70 % de la producción. Solo el 12 % de la producción total se exporta a diferentes destinos como Estados Unidos y Canadá, siendo las especies que más se comercializan: gladiola (*Gladiolus*; L), rosa (*Rosa* L.), liliium (*Lilium candidum*; L.), alstroemeria (*Alstroemeria*; L), clavel, esquejes sin raíz, plantas en maceta y follaje.

Según el SIAP (2017), la superficie cultivada del clavel en el 2015 fue 451 ha, donde Coatepec de Harinas cultivó 206 ha, Villa Guerrero 228 ha y Tenango del Valle 15 ha, además de que no hay información registrada en otros estados, se pueden observar plantíos en el estado de Morelos, Puebla, Baja california. México importa gran parte de la flor de corte, siendo el clavel una opción para los agricultores. México cuenta con muchos microclimas en los que el clavel puede producirse, siendo las áreas montañosas del país las más adecuadas para su producción (Besemer 1998).

2.3 Condiciones para la producción de clavel

2.3.1 Necesidades de suelo

El clavel se desarrolla muy bien en terrenos de textura franco-arenosa, condiciones que facilitan la penetración y el normal desarrollo del sistema

radicular. Es importantísimo un buen drenaje para evitar encharcamientos, que favorecen el desarrollo de enfermedades y la asfixia radicular, a la vez que disminuye la acumulación de altas concentraciones de sales en el suelo, que podrían llegar a ser tóxicas para el clavel. EL pH ideal es que oscile entre 6.5 y 7. El pH ácido favorece el desarrollo de hongos; uno de los más característicos y peligrosos es el *Fusarium* (Hernández 1983).

2.3.2 Luminosidad

La luminosidad es importante para el desarrollo normal del clavel, influye enormemente en calidad, sanidad y producción total. La falta de luz se manifiesta por la formación de brotes florales débiles, retardan en el crecimiento y aumenta el establecimiento de las enfermedades. Durante los días largos se aceleran los procesos de formación y apertura de flores, mientras que, durante los días cortos, de menos horas de luz, los entrenudos aumentan su crecimiento en longitud. Durante los días largos se aceleran los procesos de formación y apertura de flores, mientras que, durante días cortos, los entrenudos aumentan en longitud debido a que reciben menos horas luz, el clavel posee un fotoperiodo promedio crítico de 13 horas (Hernández 1983).

2.3.3 Temperatura

Tiene influencia en el crecimiento y en la producción. La temperatura ideal para el clavel es entre 12 y 14 °C durante la noche y entre 20 y 24 °C durante el día. Las temperaturas por debajo de 6 °C pueden producir deformaciones en la flor y cálices estallados, con una considerable disminución en la producción. A los 0 °C se dañan los botones florales sufriendo decoloraciones de pétalos, circunstancia que deprecia considerablemente la flor. Las oscilaciones bruscas de temperaturas diurnas respecto a las nocturnas (salto térmico extremo), hacen

que los cálices revienten. Se obtiene enraizamiento óptimo a 20 °C y 95 % de humedad relativa (Besemer, 2004).

2.4 Fecha de plantación

Para México, los meses más apropiados para establecer la plantación de claveles son abril, junio y julio, y el cultivo tiene una vida productiva de dos años; sin embargo, si la fusariosis provoca daños importantes, el cultivo solo durará un año (Linares 2004). Antes de hacer la plantación conviene sumergir los esquejes, sobre todo raíces y cuello, en una solución con benomilo, mancozeb, tiram, para prevenir enfermedades (Besemer, 2004).

2.5 Aspectos generales del género *Fusarium*

Los hongos del género *Fusarium* se distribuyen ampliamente en el mundo y son de gran importancia desde el punto de vista agrícola y económico. Su concurrencia es cosmopolita y las diversas especies son comunes en el suelo, en el aire y en el agua. Son capaces de ocasionar enfermedades en distintas especies de plantas cultivadas. Algunas variantes pueden causar infecciones oportunistas y otras producen toxinas que pueden afectar al hombre y a los animales (Booth, 1971). Algunas especies del género *Fusarium* son benéficas en la agricultura y se han utilizado en el control biológico de ciertas enfermedades causadas por especies patogénicas, principalmente de aquellas pertenecientes a la especie *Fusarium oxysporum*. Algunas especies se han utilizado como micoherbicidas, por su potencial para destruir algunas malezas (Nelson, 1990). Las enfermedades de las plantas causadas por especies del género *Fusarium* consisten en marchitamientos vasculares, manchas en las hojas, pudrición de raíces y de tallos, pudrición de frutos, granos y semillas (Nelson, 1990). En el género *Fusarium* se han reconocido entre nueve y 78 especies, dependiendo del

sistema taxonómico utilizado, el cual se basa principalmente en las características culturales típicas de las colonias y de las esporas del hongo.

2.6 Aspectos biológicos y patológicos de la especie *Fusarium oxysporum*

Fusarium oxysporum es una de las especies de mayor importancia fitopatológica, con el mayor número de plantas hospedantes y la que mayor daño económico ocasiona entre los patógenos de plantas. La especie tiene un rango de hospedantes muy amplio en plantas de importancia agrícola y ocasiona principalmente marchitamientos vasculares, seguidos de la muerte de la planta (Nelson, 1981). Algunas especies pueden ocasionar también pudrición de la corona y de las raíces en plantas (Farr *et al.*, 1989; Jones *et al.*, 1997). El hongo se caracteriza por producir colonias de crecimiento rápido y tres tipos de esporas: microconidias, macroconidias y clamidosporas.

Las microconidias son esporas unicelulares, sin septas, hialinas, de elipsoidales a cilíndricas, rectas o curvadas. Las macroconidias son esporas de pared delgada, fusiformes, largas, moderadamente curvadas, con varias células y de tres a cinco septas transversales, con la célula basal elongada y la célula basal atenuada. Las clamidosporas son esporas formadas a partir de la condensación de células de las hifas o de las macroconidias y se caracterizan por poseer paredes bastante gruesas, lo que las hace muy resistentes a condiciones ambientales desfavorables o a la ausencia de plantas hospedantes. Las clamidosporas se forman simples o en pares, son terminales o intercalares y son las principales responsables de la sobrevivencia del hongo en tejidos muertos de plantas hospedantes o en el suelo (Nelson, 1981).

Ataca diversos tipos de plantas económicamente importantes en distintos países y en diferentes regiones, causando marchitamientos vasculares y muerte de las

plantas. En hortalizas se registra atacando entre otras plantas al tomate (*Solanum lycopersicum*), apio (*Apium graveolens*), pepino (*Cucumis sativus*), cebolla (*Allium cepa*), repollo (*Brassica oleracea*), espárrago (*Asparagus officinalis*) y remolacha (*Beta vulgaris*). En frutales se ha registrado en banano (*Musa paradisiaca*), melón (*Cucumis melo L.*), guayaba (*Psidium guajava*), vid (*Vitis vinifera*). En leguminosas de grano en frijol (*Phaseolus vulgaris*), soya (*Glycine max*) alverjon (*Pisum sativum*), lenteja (*Lens culinaris*) y garbanzo (*Cicer arietinum*). En ornamentales en clavel, crisantemo (*Chrysanthemum indicum*), gladiolo (*Gladiolus spp*). (Armstrong y Armstrong, 1981; Farr *et al.*, 1989). Entre los cultivos considerados «ilícitos» se ha registrado en coca (*Erythroxylum coca*), amapola (*Papaver rhoeas*) y marihuana (*Cannabis sativa*) Esto muestra la complejidad taxonómica del género *Fusarium*; por tal razón, la identificación de las especies debe ser realizada por expertos en la materia (Armstrong y Armstrong, 1981; Connick *et al.*, 1998, Farr *et al.*, 1989).

Estas enfermedades se han tratado, especialmente, con la formación de variedades resistentes a la enfermedad. En plantaciones de clavel para exportación en la Sabana de Bogotá, desde el año 1975, se han presentado epidemias bastante severas con pérdidas económicas muy significativas, lo que ha impulsado a los productores a utilizar suelos nuevos no infestados por el patógeno y a aplicar diversas medidas de control químico, algunas de ellas bastante costosas y no eficientes (Arbeláez, 1992). Las formas especiales patogénicas de *Fusarium oxysporum* parecen haberse originado a partir de formas especiales no patogénicas o saprófitas en procesos evolutivos muy largos, principalmente en los centros de origen de las plantas hospedantes (Nelson, 1990).

Una de las dificultades encontradas para la identificación de las especies es la frecuente variación observada en las características de las colonias del hongo y

en el tamaño de las esporas tanto del género *Fusarium*, como de la especie *oxysporum*. Sin embargo, las variaciones en la patogenicidad son poco frecuentes y consisten principalmente en la pérdida o en la disminución de la virulencia y, muy rara vez, en el aumento de esa virulencia o en la capacidad de ampliar o de modificar el tipo de plantas hospedantes que puedan atacar (Kistler, 1997). Una de las posibilidades de modificar diversos aspectos patológicos es mediante la ocurrencia de mutaciones, pero la frecuencia observada en las formas especiales de *Fusarium oxysporum* es muy baja. También, la recombinación genética observada en la especie es baja, ya que no se le conoce fase sexual y, por lo tanto, no se presenta recombinación genética por este método de reproducción (Kistler, 1997).

2.7 Características y especificidad de plantas hospedantes de las formas especiales de *Fusarium oxysporum*

La especie *Fusarium oxysporum* se caracteriza por producir distintas formas especiales, ataca diversos tipos de plantas económicamente importantes en distintos países y en diferentes regiones, causando marchitamientos vasculares y muerte de las plantas.

Las cuales no se pueden diferenciar por su morfología o por las características culturales típicas de las colonias, pero son fisiológicamente diferentes por su capacidad de parasitar y ocasionar enfermedades en plantas hospedantes específicas (Nelson, 1981). Snyder y Hansen (1940) reconoció 25 formas especiales de *Fusarium oxysporum*, Booth (1971) registró 70 formas especiales y Armstrong y Armstrong (1981) reconocieron 72 formas especiales patógenas de cultivos de gran importancia económica. De acuerdo con otros autores, las formas especiales de la especie podrían pasar de un centenar (Farr *et al.* 1989).

Selectividad patogénica de *Fusarium oxysporum* se debe a que solamente las plantas hospedantes y sus exudados radicales satisfacen los requerimientos nutricionales del hongo y, por lo tanto, éste solamente puede crecer y desarrollarse en ese tipo de plantas (Nelson 1981). En distintos suelos de diferentes regiones del mundo se ha encontrado un gran número de formas no patogénicas de *Fusarium oxysporum*; estas formas se caracterizan por desarrollarse en forma epifita o saprófita en las raíces de algunas plantas, pero sin ocasionar ningún tipo de enfermedad en las plantas que las albergan (Nelson, 1981).

En algunos suelos de la Sabana de Bogotá infestados *F. sp. dianthi* y cultivados en clavel se ha observado una gran abundancia de aislamientos no patogénicos de *Fusarium oxysporum*, ocasionando algún efecto antagónico a las formas patogénicas (Camargo *et al.*, 1994). Además, algunas formas especiales se caracterizan por producir razas fisiológicas o patotipos, los cuales se distinguen entre sí por su diferente patogenicidad en distintas variedades de una misma especie de planta.

Varias razas fisiológicas se han observado en las formas especiales en *F. sp. dianthi*; se han reconocido diez razas fisiológicas (Garibaldi, 1986) siendo la raza dos la de mayor patogenicidad.

2.8 Sintomatología de la enfermedad causada por *Fusarium oxysporum*

La primera evidencia de infección es el marchitamiento de los tallos y las hojas más jóvenes, con frecuencia de un solo lado, observándose que los tallos se encorvan hacia el lado afectado. Paulatinamente el color verde del follaje va adquiriendo un color amarillo paja. Al hacer un corte transversal de los tallos afectados se observa que una parte del anillo xilemático presenta un color café y los haces vasculares están bloqueados por el micelio y los conidios del hongo.

En la etapa final de la enfermedad, la planta se marchita totalmente y muere, observándose que las raíces permanecen sin sufrir daños (Booth, 1971).

2.9 *Fusarium oxysporum dianthi*

El micelio es de color blanco a púrpura, abundante, algodonoso. Presenta microconidios abundantes, de forma cilíndrica u ovaelipsoide, con o sin septos, de 9 a 11 x 2 a 4 μm , formados a partir de fiálides simples, de 7 a 12 x 2 a 4 μm . Presenta macroconidios fusoides, de dimensiones variadas, en su mayoría con tres septos, de 30 a 44 x 3 a 5 μm , que se originan de fiálides de 25 a 35 x 4 a 6 μm o sobre esporodoquios de color violáceo. Clamidosporas lisas, intercalares, casi circulares de 8 a 11 μm . Esta especie se distingue por el tamaño y número de septos de los macroconidios y por la forma y tamaño de los microconidios. (Booth, 1971; Espinoza, 1973).

2.10 Identificación molecular de *Fusarium*

2.10.1 Marcadores moleculares

Actualmente, se están investigando diversos métodos moleculares para diferenciar las distintas formas especiales del patógeno, las formas no patogénicas del hongo y para la distinción de las razas dentro de las formas especiales. Hasta el momento no se tienen resultados concluyentes. Entre estos métodos se han utilizado el análisis de fragmentos de restricción de ADN de longitud polimórfica (RFLP), el análisis de grupos de compatibilidad vegetativa (VGC), la amplificación al azar de ADN de longitud polimórfica (RAPD), el análisis de isoenzimas y el cariotipo electroforético (Hernández *et al.*, 1998; Anzola y Rojas, 2000).

Un marcador molecular es un carácter o un gen que debido al ligamiento indica su presencia. Puede corresponder a cualquier gen, cuya expresión permite el efecto cuantificable u observable (Solís y Andrade, 2005). Se puede considerar un marcador a cualquier molécula orgánica o inorgánica que sea característica de un organismo o proceso. Según Valdez y Kahl (2000), un marcador se refiere a cualquier molécula de proteína, ARN o ADN de tamaño o peso molecular conocido que sirve para monitorear o calibrar la separación de las mismas utilizando electroforesis o cromatografía. Un marcador genético puede ser cualquier gen cuya expresión permite un efecto fenotípico que puede ser detectado fácilmente. Las técnicas moleculares empleadas para identificar el género *Fusarium* son factor de elongación e ITS.

2.10.2 Reacción en cadena polimerasa (PCR)

La reacción cadena polimerasa o PCR es una técnica que involucra la síntesis enzimática *in vitro* de millones de copias de un segmento específico de DNA. Esta técnica tiene varios requerimientos; es indispensable un molde de DNA o moléculas iniciadoras llamadas primers, cebadores o iniciadores, una enzima de DNA polimerasa resistente a fluctuaciones de temperatura, una mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfato (también llamados dNTP's), un buffer apropiado y agua para completar el volumen final de la reacción. Además, se requiere un equipo llamado termociclador que tiene la capacidad de cambiar las temperaturas dependiendo de los ciclos programados (Valasek y Repa, 2005).

La reacción PCR consiste en generar, al menos, treinta ciclos repetitivos conformados por tres pasos esenciales: el primero es la desnaturalización y consiste en la ruptura de los puentes de hidrógeno de doble cadena de DNA a cadenas sencillas, que sirvan de molde para síntesis de fragmentos de interés, la desnaturalización se lleva a cabo a 94 o 95 °C por 1 min. En el segundo paso se

produce el alineamiento (o reconocimiento) de las cadenas desnaturalizadas de DNA blanco con los iniciadores a una temperatura que facilita la complementariedad de las bases nitrogenadas de los iniciadores de DNA blanco (Rodríguez y Barrera, 2004).

III MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Sitio experimental

La investigación se realizó en el Campo Experimental del Campus Montecillo, en el Colegio de Postgraduados, Texcoco, Estado de México localizado 19° 29´ latitud norte, 98° 53´ latitud oeste, con una altitud de 2260 m. El clima es C(W_o)(W)b(y)g, descrito como templado subhúmedo con una precipitación media anual 645 mm y una temperatura media anual 15 °C, con heladas tempranas a finales de septiembre y tardías en abril (García, 1973).

3.2 Obtención del inóculo de *Fusarium oxysporum*

3.2.1. Muestreo

Se realizó muestreo dirigido en plantas con síntomas de dormilona, obteniendo un total de 16 plantas de clavel enfermas. con el síntoma visual de la infección con *Fusarium oxysporum* comúnmente llamado “la dormilona”, Los síntomas observados fue el marchitamiento de tallos y hojas jóvenes de un solo lado, encorvamiento de tallos en dirección de lado con la afección, y follaje de color amarillo paja. Las plantas se obtuvieron de una plantación ubicada a 18° 98´ 66´´ latitud norte, y 99° 79´ 29´´ longitud oeste en Tecolotepec, Coatepec de Harinas, Estado de México, región con la mayor superficie sembrada de este cultivo.

3.2.2. Obtención, aislamiento e identificación de las cepas de hongos

Se tomaron fragmentos de tallos con síntomas de marchitez y coloración café del xilema, eliminó el follaje de cada planta, dejando 5 cm del tallo principal junto con sus raíces principales. Los segmentos de planta posteriormente se lavaron

para eliminar sustrato, y con un bisturí se cortaron los tallos de forma horizontal para identificar si el anillo xilemático tiene coloración café. Si este fue el caso, entonces se procedió a realizar cortes transversales de las zonas infestadas, se tomaron secciones de 0.25 cm² de área infestada y se colocaron en una caja Petri con agua destilada estéril para enjuagarlas. El material fue lavado, y posteriormente desinfestado con hipoclorito de sodio al 2.5 % por 2 minutos y dos lavados con agua destilada estéril. El material fue sembrado en medio de cultivo papa-dextrosa agar (ver apéndice). En un matraz de 1 L se agregó 500 mL de agua destilada y 20 g de PDA (Agar dextrosa y papa); se agitó hasta que la mezcla quedó uniforme, se colocó en una olla exprés a baño maría a 100 °C, a 15 lb durante 20 24 min, y se dejó enfriar.

Después de desinfectar la mesa de trabajo, se vertió el medio en cajas Petri ante un mechero con alcohol para evitar la contaminación del medio, se dejó cuajar por 24 h y al término se sembraron los segmentos de 0.25 cm² en este medio para el crecimiento y posterior identificación de las cepas de hongos. La purificación de aislamientos por punta se realizó en agua-agar y ampicilina a 20 mg L⁻¹. Después, éste se colocó en una olla exprés a baño maría a 100 °C a 15 lb durante 20 min, y se dejó enfriar. El medio se vertió en cajas Petri ante un mechero con alcohol para evitar la contaminación del medio, se dejó cuajar durante 24 h. Se realizó una identificación preliminar con claves de Barneth y Hunter (1998) y Leslie y Summerel (2006). El hongo previamente aislado en el proceso anterior se transfirió a las cajas Petri con el medio de cultivo preparado. Para la identificación morfológica del hongo se hizo con un microscopio modelo MG-11 de la marca Iroscope (Microscopios y Balanzas S.A. de C.V.) s se presentan en el apartado de resultados.

3.2.3 Preservación de las cepas de hongos

Se realizó la preservación de aislamientos por la técnica de medio de y aceite mineral y arena estéril. Después de la obtención, aislamiento e identificación de las cepas del hongo se procedió a preservar las ocho cepas diferentes, obtenidas del procedimiento del apartado 3.2.2 para los ensayos posteriores, pues esto nos permitió tener en resguardo los hongos para utilización en los experimentos que posteriormente describiremos. Las cepas se conservaron empleando dos métodos: Conservación en aceite mineral y en arena húmeda. Cada cepa se sembró en dos tubos de ensaye (repeticiones) por cada una de los ocho cepas, dando un total de dieciséis tubos en ambos procedimientos por cada método de preservación.

3.2.3.1 Aceite mineral

Se prepararon 160 mL de PDA, con el procedimiento descrito en la sección 3.2.2, se vertieron 10 mL en cada uno de 16 tubos de ensaye con capacidad 50 mL, y se dejaron reposar 24 h para su cuajado. cumplido este tiempo, se inocularon dos tubos de ensaye con cada una de las 8 cepas de los hongos aisladas con anterioridad. Después de permitir el crecimiento de los hongos por 7 d, se agregaron 20 mL de aceite mineral previamente esterilizado a cada tubo de ensaye; éstos se taparon con algodón, y se almacenaron a temperatura ambiente para su conservación.

3.2.3.2 Arena húmeda

Se cribó arena de río tomando las piedrecillas pequeñas mientras que las partículas más finas y las piedras grandes se eliminaron. La arena seleccionada se enjuagó con agua, y se dejó secar a temperatura ambiente. A cada tubo de ensaye se le agregó 10 g de la arena 26 seleccionada, y después se procedió a

esterilizar los tubos de ensaye con arena en una olla exprés a 100 °C, 1.5 lb de presión por 1 h. Este procedimiento se realizó dos veces con un tiempo de separación de 24 h entre cada uno, y al término se dejaron en reposo durante una semana. Para la inoculación de las 8 cepas, se vertió agua estéril en la caja Petri con la cepa, y se mezcló hasta tener una solución de apariencia turbia. Después se tomaron 5 mL del medio líquido, se vertieron en cada tubo de ensaye solo hasta humedecer y en seguida se tapó cada tubo de ensaye con algodón. Se almacenaron a temperatura ambiente para su conservación y posterior uso.

3.3. Prueba de patogenicidad

Este experimento consistió en determinar la cepa con mayor grado de patogenicidad en tres cultivares.

3.3.1. Enraizamiento de esquejes de clavel

Se colectaron esquejes de clavel de e tres cultivares; Arévalo, Nobles y Florantine, cultivados por los agricultores de la localidad de Analco del municipio de San Salvador el Verde, Puebla localizado a 19° 25´ 90´´ latitud norte y 98° 51´ 20´´ longitud oeste. Los esquejes de apariencia sana eran de 10 cm de altura y fueron cortados de la planta madre a partir de un entrenudo. Para transportarlos, se envolvieron en papel estraza humedecido con agua destilada para evitar deshidratación y minimizar estrés. Para el enraizamiento, se eliminaron las hojas inferiores dejando solo 5 hojas por esqueje y haciendo un ligero corte en la parte basal del tallo.

Después se trataron con una solución de 2 g L⁻¹ de Captan 50 Plus de la empresa INGENIERIA INDUSTRIAL, S.A. DE C.V. y posteriormente la parte basal del tallo se impregnó con Radix 1000 para promover el crecimiento de raíces. Se plantaron en tubillos cilíndricos de 15 cm de largo y 5 cm de ancho, con turba

“GB reykva peat substrate remix profesional” de la empresa Réykva, esterilizada previamente durante 2 h en una autoclave a 100 °C y 1.5 lb de presión; este procedimiento se repitió a las 24 h. Los esquejes se colocaron en un túnel de 1.50 m de largo por 1.10 m de ancho con 0.90 m de altura, cubierto con plástico blanco lechoso. La parte frontal del túnel y su parte posterior se cubrieron con malla antiáfidos.

Se usó un sistema de control (SC) para ajustar las condiciones de humedad relativa (Hr) y temperatura del aire (Ta) al interior de micro túnel. Se estableció un rango de Ta y Hr programado:

$$18 \text{ °C} \leq Ta \leq 22 \text{ °C}$$

$$70 \% \leq Hr < 80 \%$$

Para que Ta y Hr al interior del micro túnel se ajustaran a los rangos establecidos se construyó un dispositivo de control. El sistema de control registró lecturas del sensor de los Dispositivos de entrada (DE) de Hr y Ta cada 5 s, enviaba la información al DCC (Dispositivo central de control) y entonces se comparaban los valores con los rangos de humedad y temperatura establecidos. Si el valor de Ta era mayor a 22 °C, el DCC encendía los dispositivos de enfriamiento (Humificador y Ventilador); cuando Ta descendía a 18 °C, se apagaban los dispositivos de enfriamiento. En cuanto a Hr, si el valor de esta variable excedía 80 %, el DCC encendía un ventilador para extraer la humedad acumulada al interior del micro túnel. El ventilador seguía encendido hasta que se lograba reducir Hr a 70 %, entonces se indicaba al DCC que apagara el ventilador. Si Hr era menor a 70 %, entonces el DCC encendía el humificador y el ventilador para aumentar la humedad relativa hasta alcanzar 80 %; cuando esto ocurría, entonces el DCC apagaba el ventilador y el humificador.

Para esto se diseñó un sistema de control (SC) a partir hardware y software “open source”. Dispositivo central de control. Para la construcción del DCC se

dispuso de la plataforma Arduino® como centro de procesamiento, control y comunicación. Como DCC se usó una placa Arduino UNO®, basada en el microcontrolador ATmega328P de la compañía ATMEL CORPORATION®. Esta placa Arduino® provee un total de 13 puertos de entrada/salida digital (incluyendo PWM) y 6 puertos análogos de entrada.

Dispositivo de entrada; se usó un sensor digital de humedad relativa (%) y temperatura del aire (°C) modelo DHT22 por cada ambiente para monitorear el estado climatológico de cada micro túnel. El sensor digital DHT22 opera bajo un rango de 0 a 100 % de humedad relativa (Hr y de 40 a 80 °C. Una resolución de 0.1 para HR y 0.1 para temperatura (°C). Una exactitud de +- 2 % para Hr y menor +- 0.5 para temperatura.

Dispositivos de salida; Como dispositivo de salida se usó un módulo genérico de 2 canales para controlar relevadores de 5 V y 10 A. Dicho módulo se usó como interruptor para los extractores y calefactores de cada micro túnel.

3.3.2 Manejo de cultivo

El trasplante de los esquejes se llevó a cabo 25 días después del enraizamiento (dde); éstos se desinfectaron en una solución de 2 g L⁻¹ de Captan 50 Plus®, en macetas con una capacidad de volumen de 2 L, llenadas con el sustrato compuesto por 20 % tezontle, 40 % tierra de monte, 40 % cascarilla de arroz, esterilizado previamente en baño maría a 100 °C por 4 h. Se aplicó la dosis de fertilización 90 -120-120, de N-P-K, usando como fuente NKS 46, multipropósito, SOP 52, micro mix, todos estos fertilizantes pertenecientes a la empresa Ultrasol®.

3.3.3 Preparación del inóculo

Se reactivaron las ocho cepas de hongos conservadas en los tubos de ensaye con aceite mineral (sección 3.2.3), y se transfirieron a cajas Petri para su crecimiento; a los siete días se volvieron a transferir a tres cajas Petri con medio de cultivo PDA por cepa, para asegurar que se contara con el suficiente micelio para la inoculación.

3.3.4 Inoculación

Después de 10 dde crecimiento del micelio de las cepas, se procedió a inocular las plantas. Para esto, con un sacabocado se tomaron rodajas del micelio de cada cepa, se colocaron 5 rodajas de micelio alrededor de la parte basal del tallo y se cubrieron con una capa delgada del sustrato; esto se hizo en cada planta de clavel, de acuerdo al tratamiento asignado (cepa del hongo aislado) según el diseño del experimento (Sección 3.3.5). Después la planta se cubrió con una bolsa de plástico de tamaño de 30 x 30 cm, la cual fue retirada 15 días después de la inoculación (ddi).

3.3.5 Diseño experimental para la prueba de patogenicidad

La prueba de patogenicidad de los hongos fitopatógenos obedece a los postulados de Koch. El experimento se realizó bajo un diseño factorial 9x3 completamente al azar con el modelo estadístico siguiente;

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + AB_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

donde:

$i = i$ -ésima cepa más el testigo (8 cepas aisladas y un testigo).

$j = j$ -ésima cultivar (3 cultivares).

$k = k$ -ésima repetición (3 repeticiones por cada tratamiento).

μ = media general, A^*B y_{ijk} = valor de la VR correspondiente a las 3 repeticiones k de las 9 cepas aisladas, con los 3 cultivares,

A_i = efecto de las 8 cepas aisladas más el testigo: C1 (*Fusarium oxysporum*), C2 (*Fusarium proliferatum*), C3 (*Rhizoctonia solani*), C4 (*Cephalosporium sp*) C5 (*Fusarium equiseti*), C6 (*Fusarium culmorum*), C7 (*Fusarium culmorum*), C8 (*Fusarium oxysporum*), T9.

B_i = efecto de las 3 cultivares; V1 (Florantine), V2 (Nobles), y V3 (Arévalo).

AB_{ij} es la interacción entre las 9 cepas aisladas más el testigo y las 3 variedades, lo que corresponde a 27 tratamientos,

ε_{ijk} es el error experimental correspondiente a las k -ésima repetición (3 repeticiones) de la i -ésima cepa más el testigo (8 cepas aisladas más el testigo) con las j -ésima cultivar (3 cultivares). Debe cumplirse que:

$$\varepsilon_{ijk} \sim NIID(0, \sigma^2).$$

La unidad experimental fue una planta de clavel, con tres repeticiones por tratamiento. Debido a este diseño experimental, se ocuparon 81 unidades experimentales, las cuales se aleatorizaron con el programa RStudio 3.4.3, 2017. Después de 100 ddi se midió el nivel de severidad del daño descritas en el apartado 3.8.3 en las plantas de clavel (cada unidad experimental).

3.4 Respuesta de genotipos de clavel a la inoculación de ocho cepas identificadas.

En experimento consistió en evaluar la respuesta de cuatro cultivares de clavel a la inoculación de 8 cepas aisladas en el apartado 3.2.2.

3. 4.1 Material a utilizar

Se usaron 4 cultivares comerciales de clavel: Rojo fuego, Camile pink, Ariel y Sumerdress, comercializadas por la empresa Plántulas de Tétela S. de R.L. de C.V.

3.4.2 Manejo de cultivo

El trasplante de los esquejes se estableció a los 25 días después del enraizamiento (dde); éstos se desinfectaron en una solución de 2 g L⁻¹ de Captan 50 Plus® y se trasplantaron en bolsas de plástico de 20 x 20 cm con capacidad de 2 L, utilizando sustrato compuesto por 20 % tezontle, 40 % tierra de monte, 40 % cascarilla de arroz, esterilizado previamente en baño maría a 100 °C por 4 h. Se fertilizó con la dosis 90-120-120, de N-P-K, se utilizó como fuente NKS 46, 18-18-18, SOP 52, micro mix, respectivamente. Todos estos fertilizantes pertenecientes a la empresa Ultrasol®.

3.4.3 Preparación del inóculo

Se tomaron muestras de arena con el inóculo (sección 3.2.3) y se transfirieron a un medio de cultivo con harina de maíz. Después de 7 d, se inoculó la semilla de mijo (*Panicum miliaceum*) con base en el siguiente procedimiento: se tomó una sección del medio de cultivo con el hongo de cada cepa y se transfirió a un frasco con 60 g de semilla de mijo previamente hidratada durante 24 h. Este proceso se repitió para cada una de las 8 cepas aisladas de acuerdo con la metodología descrita en el apartado 3.3.2. Los frascos con semilla de mijo inoculado se colocaron en una incubadora a 25 °C a un fotoperiodo 12/12 h luz/oscuridad durante 25 d. Tras este periodo se colocaron las semillas de mijo en la licuadora, se agregaron 300 mL de agua destilada estéril, y se procedió a licuar durante 1 min. La mezcla se filtró con una gaza estéril para retirar los excesos de la semilla, y se colocó en un frasco de vidrio el cual se tapó.

3.4.4 Inoculación de las plantas de clavel

La inoculación de las plantas de clavel con las cepas aisladas de acuerdo con el procedimiento anterior se hizo a los 30 ddt. Para esto se depositaron 10 mL de la

solución en cada planta alrededor de la base de su tallo, de acuerdo al tratamiento asignado por aleatorización (3.4.4). La densidad de conidios o propágulos por mL se presenta en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Densidad del inóculo / mL por solución de la cepa

Número de cepa	Cepa identificada	Densidad por mL
1	<i>Fusarium oxysporum</i>	285 x 10 ⁴ conidios
2	<i>Fusarium proliferatum</i>	20 x 10 ⁴ propágulos
3	<i>Rhizoctonia solani</i>	25 x 10 ⁴ propágulos
4	<i>Cephalosporium sp</i>	15 x 10 ³ propágulos
5	<i>Fusarium equiseti</i>	115 x 10 ⁴ conidios
6	<i>Fusarium culmorum</i>	25 x 10 ⁴ propágulos
7	<i>Fusarium culmorum</i>	60 X 10 ⁴ conidios
8	<i>Fusarium oxysporum</i>	615 x 10 ⁴ propágulos

3.4.4 Diseño experimental

El experimento se realizó bajo un diseño factorial 9 x 6 completamente al azar con el modelo estadístico siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + AB_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

donde:

i = i -ésima es cepa aislada más el testigo (8 cepas y un testigo),

j = j -ésima cultivar (4 cultivares).

k = k -ésima repetición (5 repeticiones por cada tratamiento).

$A*B_{yijk}$ = es la interacción entre cepa y el cultivar (36 tratamientos). valor de la VR correspondiente a las 5 repeticiones k de las 9 cepas aisladas, con las 3 cultivares.

μ = es la media general.

A_i = es el efecto de las 8 cepas aisladas más el testigo: C1 (*Fusarium oxysporum*), C2 (*Fusarium proliferatum*), C3 (*Rhizoctonia solani*), C4(*Cephalosporium sp*) C5 (*Fusarium equiseti*), C6 (*Fusarium culmorum*), C7 (*Fusarium culmorum*), C8 (*Fusarium oxysporum*), C9 (Testigo).

B_i = efecto de los 4 cultivares; V1 (Rojo fuego), V2 (Camile pink), V3 (Ariel) y V4 (summerdress).

AB_{ij} es la interacción entre la cepa y el cultivar variedad (36 tratamientos),

ε_{ijk} es el error experimental correspondiente a la repetición, cepa y cultivar..

Debe cumplirse que: $\varepsilon_{ijk} \sim NIID(0, \sigma^2)$.

La unidad experimental fue una planta de clavel y con cinco repeticiones por tratamiento. Debido al diseño experimental usado, se ocuparon 180 unidades experimentales las cuales se aleatorizaron con el programa RStudio versión 3.4.3, 2017.

3.5 Respuesta de genotipos de clavel a *Fusarium oxysporum*.

Este experimento consistió en evaluar la respuesta de cuatro cultivares de clavel a la inoculación con dos niveles de inóculo de *Fusarium oxysporum*.

3. 5.1 Material a utilizar

Se usaron 4 cultivares comerciales de clavel: Durcal, Bien fait, Brigquette, y Camile pink, comercializados por la empresa Plántulas de Tétela S. de R.L. de C.V.

3.5.2 Manejo de cultivo

El trasplante de los esquejes se realizó a los 25 días después del enraizamiento (dde); éstos se desinfectaron en una solución de 2 g L⁻¹ de Captan 50 Plus® y se trasplantaron en bolsas de plástico de 20 x 20 cm con capacidad de 2 L, llenadas con el sustrato compuesto por 20 % tezontle, 40 % tierra de monte, 40 % cascarilla de arroz, esterilizado previamente en baño maría a 100 °C por 4 h. Se fertilizó con la dosis 90-120-120, de N-P-K, utilizando como fuente NKS 46,

multipropósito, SOP 52, micro mix, respectivamente. Estos fertilizantes pertenecientes a la empresa Ultrasol®.

3.5.3 Preparación del inóculo

Se tomaron muestras de arena con de la cepa 1 (C1, *Fusarium oxysporum*) obtenida con el método de preservación en arena húmeda de acuerdo a la sección 3.2.3, y se transfirió a un medio de cultivo con harina de maíz. Después de 7 d, se inoculó con esta cepa la semilla de mijo previamente hidratada por 24 h con base en la siguiente metodología: Se tomó una sección del medio de cultivo con la Cepa 1 y se transfirió a un frasco con 60 g de mijo, después el frasco se colocó en una incubadora a 25 °C a 12/12 h luz/obscuridad durante 25 d. Trascurrido este periodo, las semillas de mijo se colocaron en una licuadora, se les agregó 300 mL de agua destilada estéril, y se procedió a licuar durante 1 min. La mezcla se filtró con una gaza estéril para retirar los excesos de la semilla, y se colocó en un frasco de vidrio el cual se tapó.

3.5.4 Inoculación de las plantas de clavel

La inoculación de las plantas de clavel con la Cepa 1 *Fusarium oxysporum* se realizó 30 días después del trasplante (ddt) con la solución preparada en el procedimiento anterior. Para esto, se depositaron 10 mL de la solución alrededor de la base del tallo de cada planta, de acuerdo al tratamiento asignado según la aleatorización del diseño experimental establecido (3.5.4) con una densidad de 99×10^3 conidios por mL.

3.5.5 Diseño experimental

El experimento se realizó bajo un diseño factorial 4X2 completamente al azar, su modelo estadístico es el siguiente;

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + AB_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

donde:

i = i -ésima es cepa 1 (*Fusarium oxysporum*) y testigo

j = j -ésima cultivar (4 cultivares).

k = k -ésima repetición (5 repeticiones por cada tratamiento).

$A*B_{ijk}$ = es la interacción entre cepa y el cultivar (8 tratamientos), valor de la VR correspondiente a las 5 repeticiones k de la Cepa 1 (*Fusarium oxysporum*) y testigo, con los 3 cultivares,

μ es la media general,

A_i = es el efecto de las 2 cepas aisladas más el testigo: C1 (*Fusarium oxysporum*) y testigo.

B_j = efecto de los 4 cultivares; V1 (Durcal), V2 (Bien fait), V3 (Briguette) y V4 (Camile pink).

AB_{ij} es la interacción entre la cepa y el cultivar variedad (8 tratamientos),

ε_{ijk} es el error experimental correspondiente a la repetición, cepa y cultivar.

Debe cumplirse que: $\varepsilon_{ijk} \sim NIID(0, \sigma^2)$.

La unidad experimental fue una planta de clavel con ocho repeticiones por tratamiento. De acuerdo con este modelo estadístico se ocuparon 64 unidades experimentales, mismas que se aleatorizaron con el programa RStudio versión 3.4.3, 2017.

3.8 Variables respuesta

3.8.1 Variables ambientales

Se registró la temperatura del aire (°C) y humedad relativa (%) cada hora a 2 m sobre el suelo con un “Data logger”, Modelo H08-003-02 (Hobo® ONSET, Inc.) en cada experimento.

3.8.2 Variables fisiológicas

Para el experimento “Respuesta de la planta de clavel a la inoculación de ocho cepas aisladas” A los 40 días después de la inoculación (ddi). Mientras en el experimento “Respuesta de la planta de clavel a *Fusarium oxysporum*”. se midieron de 11:30 am a 12:30 pm en la hoja apical completamente extendida del segundo nudo, las siguientes variables: tasa de fotosíntesis neta (F) ($\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), conductancia estomática(C) ($\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y temperatura de la hoja (TH) ($^{\circ}\text{C}$), tasa de transpiración (T) ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) en 5 plantas (una planta por repetición) con un analizador de gases “Infrared Gas Analyzer” (IRGA) modelo LI-6400XT (LICOR®).

A la cosecha (45 ddi) se registró la biomasa seca (g/planta) de raíz (BSR), tallo (BST), limbos (BSH), botones florales (BSB), flores (BSF) y total por planta (BSTotal), cinco repeticiones (una planta por repetición) para el experimento de las ocho cepas aisladas y en ocho repeticiones para el experimento de *Fusarium oxysporum*.

Cada órgano se introdujo en sobres de papel que se colocaron en una estufa de modelo THELCO 130DM, PRECISION SCIENTIFIC a una temperatura de 70°C por 72 h o hasta alcanzar peso constante. Estas variables solo fueron medidas en los experimentos “Respuesta de la planta de clavel a la inoculación de las ocho cepas aisladas” (Sección 3.4) y “Experimento con *Fusarium oxysporum*” (Sección 3.5).

3.8.3 Severidad de la infección

Se registró la severidad de la infección visual del área externa de la planta (SEP) y de la severidad interna del tallo (SIT), de acuerdo con las escalas en los Cuadros 2 y 3.

Cuadro 2. Escala de severidad de la infección por *Fusarium oxysporum* en la parte externa de la planta de clavel. (Arbelaez y Calderón, 1991).

Valor	Síntomas
0	Planta sin síntomas
1	Planta con síntomas en el primer tercio
2	Planta con síntomas en el segundo tercio
3	Planta con síntomas en el tercio superior
4	Planta muerta

Cuadro 3. Escala de Severidad interna de daño al tallo de la planta de clavel provocado por *Fusarium oxysporum* (Núñez 1978).

Valor	Síntomas
1	Plantas con pudrición basal muy superficial
2	Evidencia definida de pudrición basal interna 0.1 a 1.0 cm longitud
3	Pudrición extendida interna de 1.1 a 2.5 cm
4	Pudrición basal extendida interna 2.6 a 4.0 cm
5	Pudrición basal extendida a más 4.0 y plantas muertas.

La prueba de patogenicidad se realizó a los 100 ddi. En los experimentos “Respuesta de la planta de clavel a la inoculación de las ocho cepas aisladas” (Sección 3.4), y “Respuesta de la planta de clavel a *Fusarium oxysporum*” (Sección 3.5) a los 45 ddi. Para estos dos experimentos también se midió el porcentaje de plantas muertas (PM).

3.8.4 Variables morfológicas

Se midió la longitud del tallo principal (LTP) (cm) desde la base del tallo hasta la parte apical, con una regla graduada; grosor del tallo principal (GT) (cm) con un vernier (Waveshare 5inch HDMI modelo C1150YZ1 tipo digital). En cada unidad experimental se registró el número de tallos (NT), número de entrenudos (NE), botones florales (NB), flores (NF). Además, se registró el área foliar (AF) (cm²/planta), que se determinó con un integrador de área foliar modelo LI-3100 (LI-COR, Nebraska, USA). Se realizó en los experimentos “Respuesta de la planta de clavel a la inoculación de las ocho cepas aisladas” (Sección 3.4) y “Experimento con *Fusarium oxysporum*” (Sección 3.5) a los 45 ddi.

3.9 Técnica molecular para la identificación de *Fusarium oxysporum*

Esta técnica permite validar la identificación de un hongo realizada por aislamiento e identificación morfológica. En esta investigación, se identificó al hongo *Fusarium oxysporum* la Cepa 1, que fue la que presentó mayor patogenicidad y la Cepa 2, con el que se inocularon las plantas de clavel. Después de inocular el hongo en las plantas, se aislaron nuevamente de las plantas inoculadas y con esta técnica molecular se determinó la secuencia de las muestras lo que permitió consensarla en la base de datos BLAST tree view del NCBI 2018.

3.9.1 Extracción de DNA en hongos mediante el método CTAB 2 % y acetato de sodio

Se precalentó el CTAB a 2 % (Tris-HCL 10 mM, pH 8.0; Na₂ EDTA 2 H₂O mM, pH 8.0; CTAB: NaCL 1.4 M) a 80 °C en baño maría, del cual se agregó 1 mL en tubos Eppendorf de 2 mL. Se tomó micelio de la caja Petri que contiene el hongo denominado *Fusarium oxysporum*, se agregó al tubo con CTAB, después se agitó, se procedió a incubar los tubos en baño maría a 96 °C por 60 min, mezclando en intervalos de 10 min utilizando el vórtex.

Después, se centrifugó a 11,500 x g por 5 min. Se pasó el sobrenadante a tubos nuevos de 2 mL, al cual se le agregó 500 µL de cloroformo- alcohol isoamílico (24:1) y se agitó por inversión por 10 min. Se procedió a centrifugar a 11,500 x g durante 10 min. Se extrajo la fase acuosa y se colocó en tubos nuevos de 2 mL, al cual se le agregó 700 µL de cloroformo- alcohol isoamílico (24:1), se agitó por inversión por 10 min, y centrifugó a 11,500 x g durante 10 min. Se transfirió la fase acuosa a tubo nuevo de 1.5 mL con 950 µL de etanol absoluto al 100 %, previamente enfriados a -20 °C y se mezcló suavemente por inversión al menos 10 veces. Se incubó a -20 °C durante 2 h. Pasado este tiempo se procedió a

centrifugar a 11,500 x g durante 30 min. Durante este tiempo se formó un sobrenadante el cual se decantó evitando perderlo. A este se agregó 400 μL de agua HPLC incubándolo a 55 °C por 15 min. Se añadió 34 μL de NaOAc 3M y 1 mL de etanol al 95 %, y se colocaron los tubos a -20 °C por 1 h. Se centrifugó a 11,500 x g durante 5 min y se decantó el sobrenadante. Se lavó con 600 μL de isopropanol al 70 % y se centrifugó por 10 min a 11,500 x g. Se dejó secar la pastilla por al menos 30 min. Suspender la pastilla con 70 μL de agua HPLC e incubar a 80 °C durante 10 min.

3.9.2 Cuantificación de ADN ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$)

La cuantificación de ácidos nucleicos se determinó por la capacidad que tiene la molécula de DNA de absorber la luz ultravioleta. Esto permite saber la calidad; entre mayor sea ésta, menor cantidad de ADN extraído se necesitó, además de mayor certeza en los resultados de secuenciación y cantidad DNA extraído permitió hacer en el procedimiento anterior. La cuantificación de ADN se llevó a cabo en un espectrómetro modelo NanoDrop 2000/2000c (Thermo Fisher Scientific).

Procedimiento:

Se colocó 1 μL de agua destilada estéril en el NanoDrop y se limpió con papel suave. Se colocó 1 μL de la solución blanco, se presionó el botón “blank” en la computadora para verificar que el NanoDrop no esté sucio, lo cual, en su caso, alteraría la lectura; posteriormente secar. Después, se colocó 1 μL de la muestra a cuantificar obtenida de acuerdo a la metodología de la sección anterior y se procedió a darle espín durante 20 s. Después, se presionó el botón “measure”. Se procedió esperar unos segundos hasta que apareció la lectura y entonces se levantó el brazo del equipo, se limpió con papel suave la superficie donde se depositó la muestra, y se repitió el procedimiento en cada lectura. Después de

esta cuantificación, la muestra de ADN se almacenó a -20 °C en congelador tipo “Ultracongelador Thermo Scientific Modelo 115V 14.9 pies cúbicos.

3.9.3 Amplificación por PCR de la región del espacio transcrito interno (ITS) del ADN ribosomal y el gen del factor de elongación de la traducción 1 α (TEF) para *Fusarium*.

Para amplificar este loci, se utilizaron los primers 1TS5, 1TS4 y TEF (White *et al.*, 1990). Se preparó la mezcla de reacción presentada en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Lista de reactivos para la mezcla de PCR.

Reactivo	Cantidades para una reacción (μL)
H ₂ O	7.86
Buffer 5X	3.0
Dntp´s (2.5 mM)	0.6
Primers 1TS4 (10 pM)	0.18
Primers 1TS5 (10 pM)	0.18
Primers TEF (10 pM)	0.18
Taq DNA polimerasa (5U)	0.18
DNA (60 a 100 ng)	3.0
Total	15

Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador tipo “Ultracongelador Thermo Scientific Modelo 115V 14.9 pies cúbicos. con el programa mostrado en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Programa para termociclador para amplificación de ADN.

Numero de Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	95	4
35	95	1
35	58	1
35	72	2
1	72	10

3.10 Análisis estadísticos

Se realizó un análisis exploratorio de los datos para verificar su normalidad en los tres experimentos. Como las variables no cumplieron con los supuestos de normalidad y homogeneidad, se aplicaron métodos no paramétricos para su análisis, entre otros el método de comparación de tratamientos de Wilcoxon-Kruskal-Wallis y Wilcoxon DSCF (análisis de comparación múltiple por parejas) (Hollander y Wolfe, 1999). Con el programa estadístico SAS 9.4, 2012.

IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Cepas aisladas de hongos

Del proceso de aislamiento de los hongos de las plantas de clavel, descrito en el apartado 3.2, se identificaron 8 cepas (Cuadro 6).

Cuadro 6. Cepas de hongos aisladas e identificadas de Tecolotepec, Coatepec de Harinas, Estado de México de acuerdo con la metodología descrita en el apartado 3.2.

Numero de cepa	Identificada
1	<i>Fusarium oxysporum</i>
2	<i>Fusarium proliferatum</i>
3	<i>Rhizoctonia solani</i>
4	<i>Cephalosporium sp</i>
5	<i>Fusarium equiseti</i>
6	<i>Fusarium culmorum</i>
7	<i>Fusarium culmorum</i>
8	<i>Fusarium oxysporum</i>

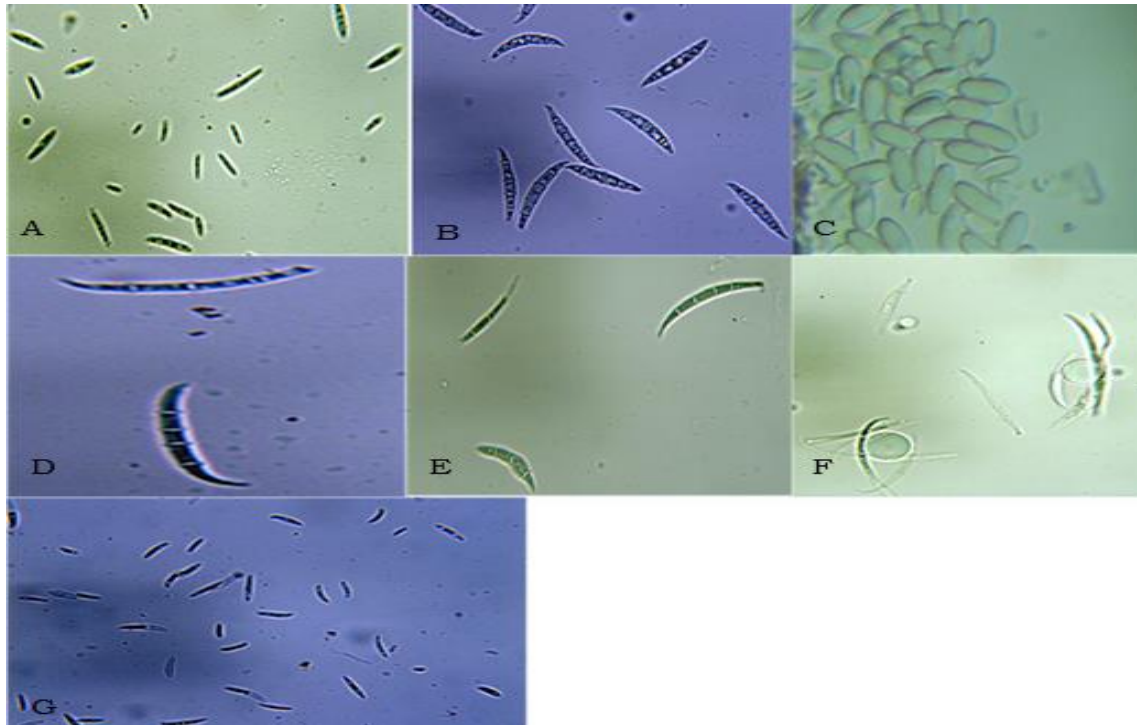


Figura 1. Imágenes de hongos identificados a una resolución de 72 pixeles/pulgada de muestras de Tecolotepec, Coatepec de Harinas, Estado de México.

A) *Fusarium oxysporum* (Cepa 1). B) *Fusarium proliferatum* (Cepa 2). C) *Cephalosporium* sp. (Cepa 4). D) *Fusarium equiseti* (Cepa 5). E) *Fusarium culmorum* (Cepa 6). F) *Fusarium culmorum* (Cepa 7). G) *Fusarium oxysporum* (Cepa 8).

4.2 Prueba de patogenicidad

La temperatura promedio durante los 130 días después del trasplante (ddt) que tuvo las pruebas de patogenicidad fue 20.1 °C y la humedad relativa de 54.0 % (Figura 2 y 3).

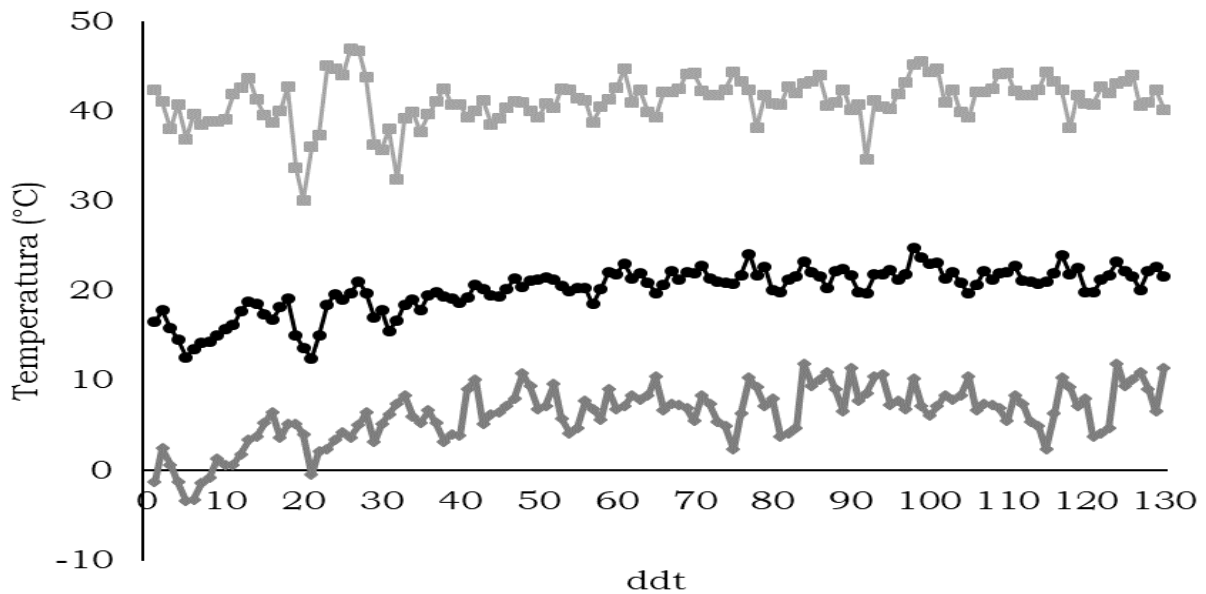


Figura 2. Temperatura mínima, media y máxima del aire de 130 ddt hasta el muestreo destructivo en tres cultivares de clavel en Motecillo, Texcoco, Estado de México de 9 de diciembre 2017 a 9 de abril 2018.

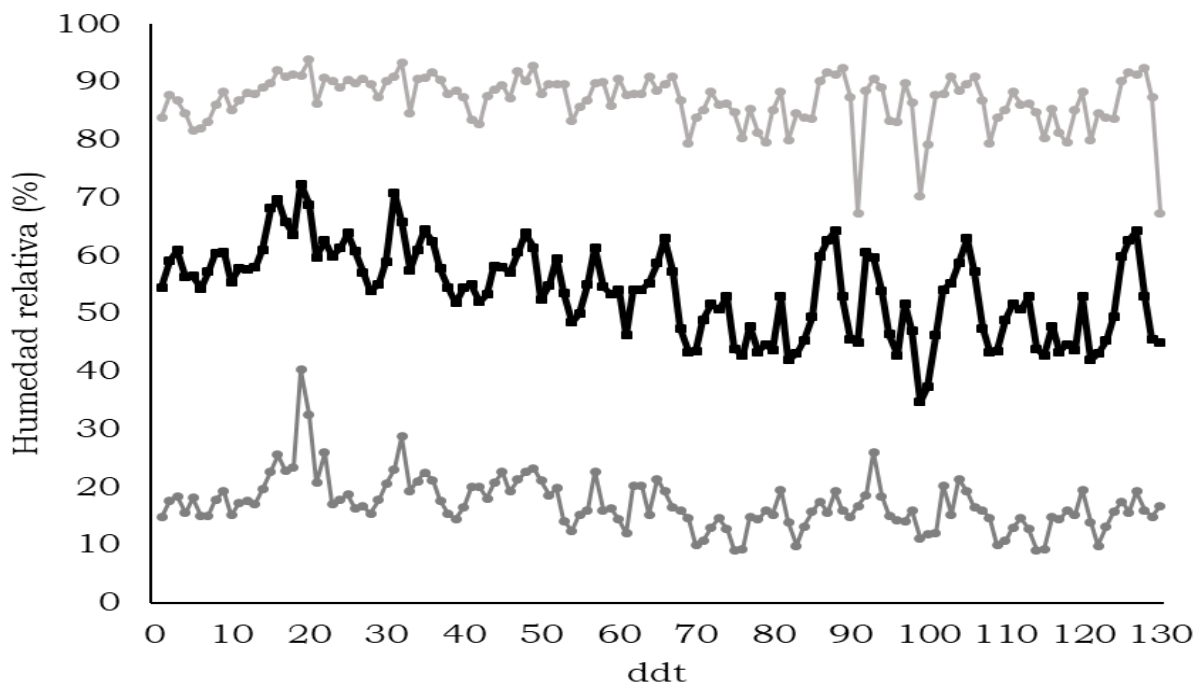


Figura 3. Humedad relativa mínima, media y máxima del aire de 130 ddt hasta el muestreo destructivo en tres cultivares de clavel en Motecillo, Texcoco, Estado de México de 9 de diciembre 2017 a 9 de abril 2018.

El nivel de severidad con base en las variables SEP y SIT fue similar entre variedades (Cuadro 7). Las cepas 1 (*Fusariumm oxysporum*) y 2 (*Fusarium culmorum*) provocaron el mayor daño o fueron las más patogénicas de acuerdo a SEP y SIT en los tres cultivares, bajo el ambiente antes mencionado (Cuadro 8).

Los tratamientos que presentaron mayor daño de acuerdo a las variables de severidad fueron Floriante*Fusarium oxysporum* (Cepa 1) así como Floriante*Fusarium culmorum* (cepa 2); las otros dos cultivares también presentaron severidad aunque en menor grado (Cuadro 9). Por tanto de acuerdo a los resultados presentados *Fusarium oxysporum* (Cepa 1) y *Fusarium culmorum* (Cepa 2) estas dos cepas, provocan la mayor mayor patogenicidad.

Cuadro 7. Promedios de las variables severidad en cultivares de clavel cultivadas en un invernadero en Montecillo, México, del 2 de enero al 9 de abril del 2018.

VARIABLES	CULTIVARES			Pr > Chi-cuadrado	N
	Floriantine	Nobles	Arévalo		
SEP	0.89 a	0.67 a	0.70 a	NS	27
SIT	1.11 a	1.19 a	0.70 a	NS	27

N: Número de observaciones; SEP: Severidad externa de la planta; SIT: Severidad interna del tallo; Pr>Chi-cuadrado: indica el valor estadístico de significancia; NS: indica que no hay diferencias significativas, Valores con la misma letra minúscula nos son estadísticamente diferentes, según la prueba no paramétrica de Wilcoxon-Kruskal-Wallis.

Cuadro 8. Promedios de las variables severidad de las ocho cepas aisladas y un testigo en cultivares de clavel bajo condiciones de invernadero en Montecillo, México, del 2 de enero al 9 de abril del 2018.

CEPAS	VARIABLES	
	SEP	SIT
<i>Fusarium oxysporum</i> (Cepa 1)	2.44 a	4 a
<i>Fusarium culmorum</i> (Cepa 2)	2.33 a	4.33 a
<i>Rhizoctonia sp.</i> (Cepa 3)	0 d	0 c
<i>Cephalosporium sp.</i> (Cepa 4)	0 d	0 c
<i>Fusarium equiseti</i> (Cepa 5)	0 d	0 c
<i>Fusarium culmorum</i> (Cepa 6)	0.33 d	0 c
<i>Fusarium culmorum</i> (Cepa 7)	0 d	0.33 c
<i>Fusarium oxysporum</i> (Cepa 8)	1.67 b	0.89 b
Testigo	0 d	0 c
Pr > Chi-cuadrado	**	**
N	9	9

N: Número de observaciones; SEP: Severidad externa de la planta; SIT: Severidad interna del tallo; Pr > Chi – cuadrado: indica el valor estadístico de significancia. Valores seguidos por el símbolo (**) indican diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$), Valores con diferente letra minúscula son estadísticamente diferentes, según la prueba no paramétrica de Wilcoxon-Kruskal-Wallis.

Cuadro 9. Promedios de las variables severidad de los tratamientos en cultivares de clavel bajo condiciones de invernadero en Montecillo, México, del 2 de enero al 9 de abril del 2018.

TRATAMIENTO	VARIABLES	
	SEP	SIT
Floriantine infestado con <i>Fusarium oxysporum</i> (T1)	3 a	4.33 a
Floriantine infestado con <i>Fusarium culmorum</i> (T2)	3 a	4.33 a
Floriantine infestado con <i>Rhizoctonia sp.</i> (T3)	0 e	0 d
Floriantine infestado con <i>Cephalosporium sp.</i> (T4)	0 e	0 d
Floriantine infestado con <i>Fusarium equiseti</i> (T5)	0 e	0 d
Floriantine infestado con <i>Fusarium culmorum</i> (T6)	0 e	0 d
Floriantine infestado con <i>Fusarium culmorum</i> (T7)	0 e	0 d
Floriantine infestado con <i>Fusarium oxysporum</i> (T8)	2 c	1.33 c
Floriantine (Testigo) (T9)	0 e	0 d
Nobles infestado con <i>Fusarium oxysporum</i> (T10)	2.67 b	4 a
Nobles infestado con <i>Fusarium culmorum</i> (T11)	2.33 b	4 a
Nobles infestado con <i>Rhizoctonia sp.</i> (T12)	0 e	0 d
Nobles infestado con <i>Cephalosporium sp.</i> (T13)	0 e	0 d
Nobles infestado con <i>Fusarium equiseti</i> (T14)	0 e	0 d
Nobles infestado con <i>Fusarium culmorum</i> (T15)	0 e	0 d
Nobles infestado con <i>Fusarium culmorum</i> (T16)	0 e	0 d
Nobles infestado con <i>Fusarium oxysporum</i> (T17)	1 d	0.67 c

Nobles (Testigo) (T18)	0 e	0 d
Arévalo infestado con <i>Fusarium oxysporum</i> (T19)	1.67 c	2.67 b
Arévalo infestado con <i>Fusarium culmorum</i> (T20)	1.67 c	2 b
Arévalo infestado con <i>Rhizoctonia sp.</i> (T21)	0 e	0 d
Arévalo infestado con <i>Cephalosporium sp.</i> (T22)	0 e	0 d
Arévalo infestado con <i>Fusarium equiseti</i> (T23)	0 e	0 d
Arévalo infestado con <i>Fusarium culmorum</i> (T24)	1 d	0 d
Arévalo infestado con <i>Fusarium culmorum</i> (T25)	0 e	1 c
Arévalo infestado con <i>Fusarium oxysporum</i> (T26)	2 c	0.67 c
Arévalo (Testigo) (T27)	0 e	0 d
Pr > Chi-cuadrada	**	**
N	3	3

N: Número de observaciones; SEP: Severidad externa de la planta; SIT: Severidad interna del tallo; Pr > Chi – cuadrado: indica el valor estadístico de significancia.), y valores seguidos por el símbolo (**) indican diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$), Valores con diferente letra minúscula son estadísticamente diferentes, según la prueba no paramétrica de Wilcoxon-Kruskal-Wallis.

4.3 Respuesta de genotipos de clavel a la inoculación de las ocho cepas identificadas.

La temperatura promedio durante los 70 días después del trasplante de duración de las pruebas hasta el muestreo destructivo fue de 21.6 °C y la humedad relativa de 52.1 % (Figura 4 y 5).

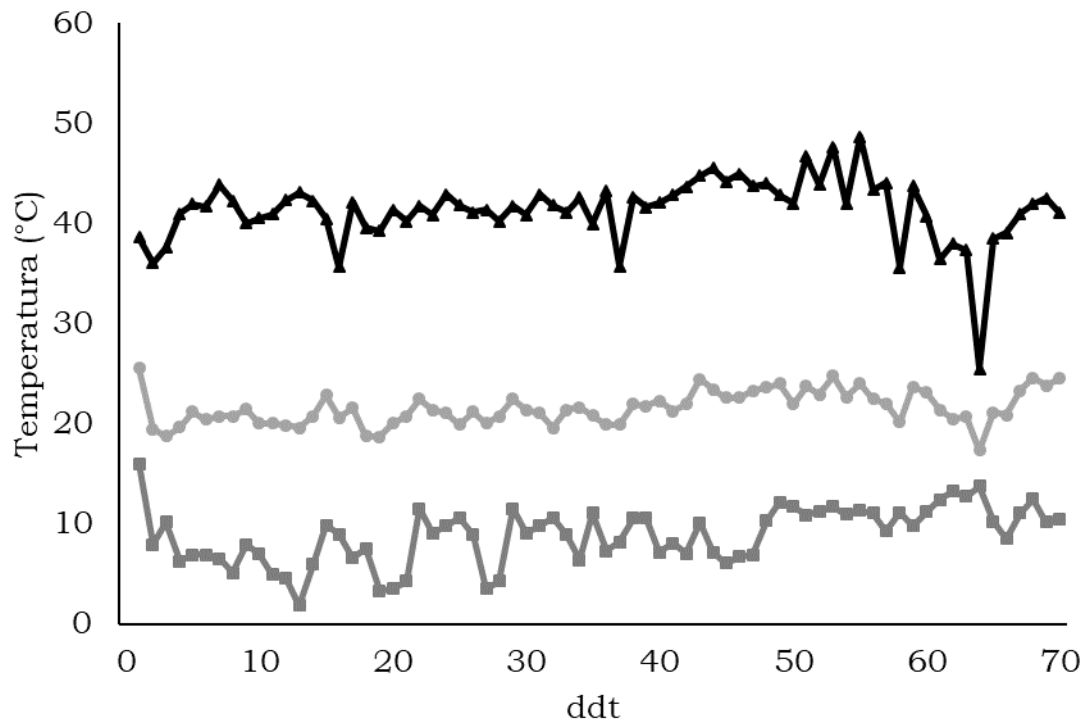


Figura 4. Temperatura del aire mínima, media y máxima a los 70 ddt hasta el muestreo destructivo en tres cultivares de clavel en Motecillo, Texcoco, Estado de México del 9 de diciembre 2017 al 9 de abril 2018.

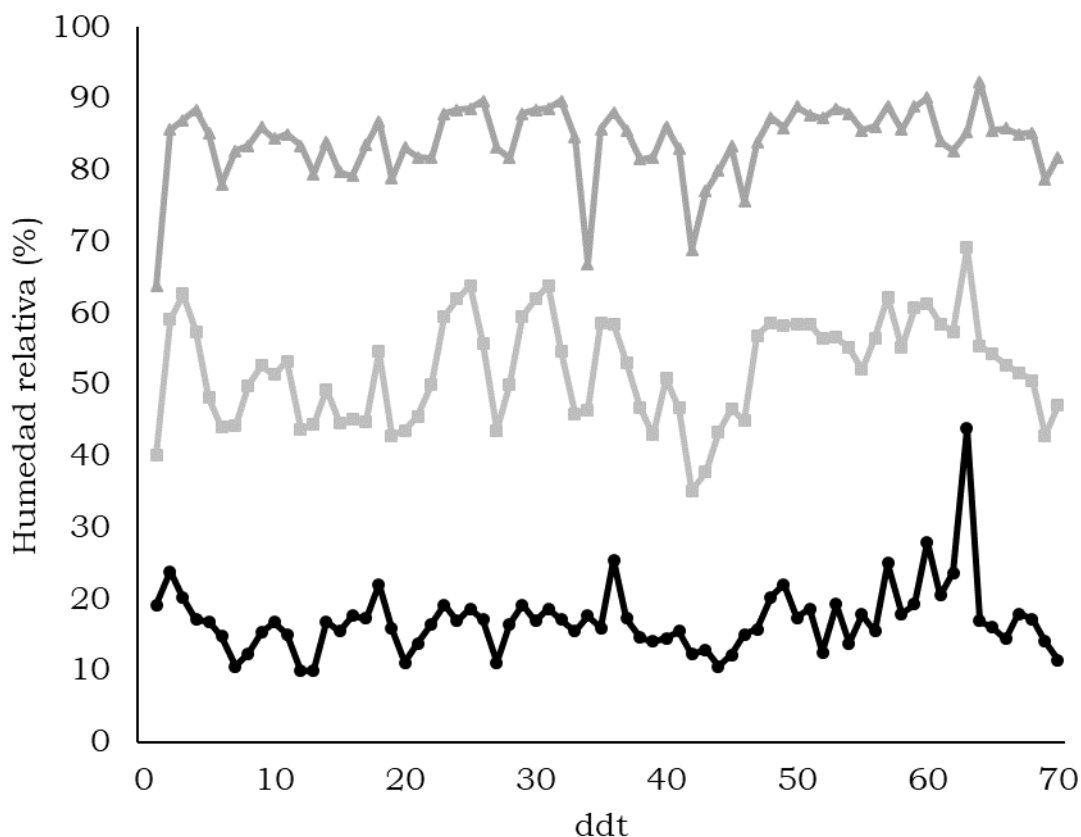


Figura 5. Humedad relativa mínimas, máximas y promedio de los 70 ddt hasta el muestreo destructivo en tres cultivares de clavel en Motecillo, Texcoco, Estado de México del 9 de diciembre 2017 al 9 de abril 2018.

Los cultivares presentaron un comportamiento distinto en la biomasa seca de los órganos de las plantas (Cuadro 10). Los cultivares Rojo Fuego, Ariel y Summerdress presentaron mayor BST que Camile Pink, pero Rojo Fuego presentó la menor BSB. Summerdress presentó la mayor BSH mientras que la menor la obtuvo Camile Pink. Además, los cultivares Camile pink y Ariel presentaron la mayor BSF. Todos los cultivares presentaron una respuesta similar en F, C, TH y T (Cuadro 10).

Los cuatro cultivares presentaron una respuesta similar en las variables de severidad (SEP y SIT). el cultivar Sumerdress presentó el mayor NT y AF. Rojo fuego presentó el menor NB y el menor NF, pero en cambio tuvo la mayor LTP y el mayor GT. Camile Pink presentó el menor NT, NE y AF por planta (Cuadro 11).

El comportamiento distinto de los cuatro cultivares en las variables, fisiológicas, morfológicas, se debe a que los cultivares se comportan de acuerdo al ambiente, a su genotipo, y a factores de estrés como son los patógenos.

La infestación de las plantas de clavel con ocho cepas de hongos causó respuesta similar en las variables BSR, BST, BSH y BSTotal, F, C, TH, T, LTP, GT, NE, NB, NF y AF por planta. La Cepa 1 (*Fusarium oxysporum*) presentó la menor BSB y BSF (cuadro 12) Las Cepas 1, 7 y 8 de *F. oxysporum* y *F. culmorum* (Cuadro 13) mostraron mayores valores de SEP, mientras que, la Cepa 1 (*F. oxysporum*) fue la que causó el mayor valor de SIT, es decir, provocó el mayor daño interno del tallo. En este sentido, *Fusarium oxysporum* es el patógeno que más daño causó a los genotipos de clavel bajo las condiciones ambientales del experimento.

Los tratamientos causaron respuestas similares en la F, C, T, TH, LTP, GT, NE, NB, NF y AF por planta en clavel. Los tratamientos T4 y T7 (Cuadro 14) que consistieron en inocular al cultivar Rojo fuego con *Cephalosporium sp.* y una cepa de *F. culmorum*, respectivamente, presentaron menores valores de BSR, e iguales valores de BST, BSH y BSTotal en comparación con el tratamiento testigo del mismo cultivar, mientras que el resto de los tratamientos aplicados en este cultivar presentaron valores igual o mayor que el testigo en las variables respuesta de la biomasa de cada órgano vegetal.

Los tratamientos aplicados al cultivar Camile pink que consistieron en la inoculación de *Fusarium oxysporum* (Cepa 1 y Cepa 8) mostraron respuestas similares para las variables respuesta de biomasa seca de los diversos órganos vegetales, siendo estas dos cepas las que presentaron la mayor reducción de biomasa seca en la mayoría de los órganos en comparación con el testigo de este cultivar. Los tratamientos aplicados al cultivar Ariel causaron mayores valores

de BSF y BSTotal que el testigo, a excepción de los tratamientos, que consistieron en infestar las plantas de clavel del cultivar Ariel con *Rhizoctonia* sp. y con *Cephalosporium* sp. que presentaron valores de las anteriores variables respuestas iguales que el testigo de este cultivar; el T19 con la Cepa 1 de *Fusarium oxysporum* causó menores valores de BSR y BST que el testigo de este cultivar. El cultivar Summerdress inoculado con la mayoría de las cepas causó valores de BSR, BST, BSH, y BSTotal, menores que el testigo para este cultivar, lo cual indica que Summerdress es particularmente sensible a las cepas evaluadas, aunque no necesariamente sean de *F. oxysporum*. Solo el valor de BSF fue menor en el testigo que en los demás tratamientos aplicados al cultivar Summerdress, excepto en los valores de BSF obtenidos con los T32 y T28 (*F. oxysporum*) que fueron iguales al valor obtenido con el testigo.

Fusarium oxysporum (Cepa 1) causó menor BSR (61 %), BST (50 %), BSH (34 %), BSB (55 %), BSF (60 %) y BSTotal (42 %) con respecto al testigo del cultivar Summerdress. Algunos tratamientos con las cepas de *F. culmorum*, *Rhizoctonia* sp. y con *Cephalosporium* sp. causaron biomasa seca de órganos y total, superior al testigo (Cuadro 14); inclusive en el cultivar Ariel, la BSTotal del testigo fue menor que los demás tratamientos. Solo la BST del cultivar Rojo Fuego fue mayor con la Cepa 1 de *Fusarium oxysporum* que en el testigo. Estos resultados pueden indicar que algunos hongos pueden, bajo ciertas circunstancias, beneficiar el crecimiento de la planta de clavel, y otros pueden ser fitopatógenos, lo cual permite sugerir la necesidad de estudios posteriores para conocer los mecanismos en que estos hongos pueden beneficiar el crecimiento del cultivo de clavel.

El T10 en el cual se infestó Camile Pink con *Fusarium oxysporum* (Cepa 1) causó la mayor (SEP) de 4 según la escala medida, y de 5 de (SIT). Otro tratamiento que presentó grado alto de SEP (3.4) y SIT (4) fue el T17 con la infestación de

Fusarium oxysporum (Cepa 8) al cultivar Camile pink (Cuadro 15), aunque solo en las variables morfológicas tales como NT, NF y AF *F. oxysporum* causó menores valores que el testigo en este cultivar. En el cultivar Rojo fuego, fueron algunas cepas de *F. culmorum* y *Cephalosporium sp.* las que causaron los mayores niveles de SEP y SIT pero con valores menores a 2, por lo que este cultivar, junto con Ariel, y Summerdress mostraron resistencia a las cepas. Inclusive, algunas cepas causaron valores mayores de LTP, GT, NT, NF, y AF en algunos de estos cultivares, excepto en las variables LTP, GT, NT y AF en el cultivar Summerdress (Cuadro 15).

Con los resultados antes mencionados se pudo inferir que, bajo las condiciones ambientales del experimento, *Fusarium oxysporum* puede causar menores valores en los órganos de la planta de clavel, y que esto depende del genotipo. Además, el cultivar Camile pink es la más susceptible, mientras que Ariel la más resistente presentó una severidad baja de daño, y no hubo una reducción considerable en la biomasa seca de sus órganos.

Cuadro 10. Promedio de la biomasa seca por órgano y variables fisiológicas en cultivares de clavel bajo condiciones de invernadero en Montecillo, México, del 1 de abril al 15 de mayo del 2018.

CULTIVARES	VARIABLES									
	BSR	BST	BSH	BSB	BSF	BSTotal	F	C	TH	T
Rojo fuego	0.2 a	0.53 a	1.32 b	0.01 b	0.05 c	2.12 a	28.93 a	0.20 a	35.40 a	0.01 a
Camile pink	0.13 b	0.13 b	0.53 d	0.09 a	0.09 a	0.97 c	-	-	-	-
Ariel	0.12 b	0.30 a	0.97 c	0.07 a	0.09 a	1.55 b	-	-	-	-
Sumerdress	0.2 a	0.45 a	1.77 a	0.05 a	0.07 b	2.54 a	33.31 a	0.22 a	35.13 a	0.01 a
Pr > Chi-cuadrado	**	**	**	**	**	**	NS	NS	NS	NS
N	45	45	45	45	45	45	45	45	45	45

N: Número de observaciones; Biomasa seca (BS, mg) de R: raíz; T: tallo; H: hoja; B: Botones florales; Total: total; F: Tasa de fotosíntesis neta ($\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); C: Conductancia estomática ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); TH: Temperatura de la hoja ($^{\circ}\text{C}$); T: Transpiración ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); Pr > Chi – cuadrado: indica el valor estadístico de significancia. (**) indican diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$), (NS) No hay diferencia significativa, Valores con la misma letra minúscula nos son estadísticamente diferentes, según la prueba no paramétrica de Wilcoxon-Kruskal-Wallis.

Cuadro 11. Promedio de severidad y variables morfológicas en cultivares de clavel cultivadas en un invernadero en Montecillo, México, del 1 de abril al 15 de mayo del 2018.

CULTIVARES	VARIABLES									
	SEP	SIT	PM (%)	LTP	GT	NT	NE	NB	NF	AF
Rojo fuego	0.89 a	1.07 a	2.22 c	13.98 a	0.45 a	2.76 d	14.11 c	0.18 b	0.07 b	122.2 b
Camile pink	1.38 a	1.56 a	26.67 a	3.47 c	0.37 b	3.36 c	11.96 c	1.29 a	0.47 a	47.99 d
Ariel	1.09 a	0.64 a	0 c	5.02 b	0.37 b	4.89 a	25.91 b	1.18 a	0.44 a	97.05 c
Sumerdress	0.47 a	0.64 a	0 c	6.24 b	0.34 b	4.07 b	31.76 a	1.2 a	0.4 a	186.95 a
Pr > Chi-cuadrado	NS	NS	**	**	**	**	**	**	**	**
N	45	45	45	45	45	45	45	45	45	45

N: Número de observaciones; SEP: Severidad externa de la planta; SIT: Severidad interna del tallo; PM: Porcentaje de plantas muertas; LTP: Longitud de tallo principal (cm), GT: Grosor de tallo (cm); NT: Numero de tallo; NE: Numero de entrenudos; NB: Numero de botones; NB: Numero de flores; AF: Área foliar (cm²); Pr>Chi-cuadrado: indica el valor estadístico de significancia. El símbolo (**) indican diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$). (NS) No hay diferencia significativa, Valores con la misma letra minúscula nos son estadísticamente diferentes, según la prueba no paramétrica de Wilcoxon-Kruskal-Wallis.

Cuadro 12. Promedio de biomasa seca por órgano vegetal y variables fisiológicas por la inoculación de plantas de clavel con ocho cepas de hongos, cultivadas bajo invernadero en Montecillo, México, del 1 de abril al 15 de mayo durante el 2018.

CEPAS	VARIABLES										
	α	BSR	BST	BSH	BSB	BSF	BSTotal	F	C	TH	T
<i>Fusarium oxysporum</i> (Cepa 1)		0.13 a	0.31 a	0.85 a	0.01 b	0.02 c	0.02 a	31.30 a	0.20 a	35.40 a	0.01 a
<i>Fusarium culmorum</i> (Cepa 2)		0.16 a	0.36 a	1.29 a	0.03 b	0.10 a	0.10 a	-	-	-	-
<i>Rhizoctonia sp.</i> (Cepa 3)		0.17 a	0.36 a	1.22 a	0.06 a	0.12 a	0.12 a	-	-	-	-
<i>Cephalosporium sp.</i> (Cepa 4)		0.16 a	0.33 a	1.25 a	0.07 a	0.03 c	0.03 a	-	-	-	-
<i>Fusarium equiseti</i> (Cepa 5)		0.18 a	0.43 a	1.14 a	0.03 b	0.10 a	0.10 a	-	-	-	-
<i>Fusarium culmorum</i> (Cepa 6)		0.18 a	0.34 a	1.13 a	0.10 a	0.14 a	0.14 a	-	-	-	-
<i>Fusarium culmorum</i> (Cepa 7)		0.15 a	0.29 a	1.16 a	0.03 b	0.06 b	0.05 a	-	-	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i> (Cepa 8)		0.15 a	0.37 a	1.10 a	0.09 a	0.12 a	0.12 a	-	-	-	-
Testigo		0.21 a	0.41 a	1.20 a	0.09 a	0.03 c	0.02 a	30.94 a	0.23 a	35.13 a	0.01 a
Pr > Chi-cuadrado		NS	NS	NS	*	*	NS	NS	NS	NS	NS
N		20	20	20	20	20	20	20	20	20	20

N: Número de observaciones; Biomasa seca (BS, mg) de R: raíz; T: tallo; H: hoja; B: Botones florales; Total: total; F: Tasa de fotosíntesis neta ($\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); C: Conductancia estomática ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); TH: Temperatura de la hoja ($^{\circ}\text{C}$); T: Transpiración ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); Pr > Chi – cuadrado: indica el valor estadístico de significancia. El símbolo (*) indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$), (NS) No hay diferencia significativa; Valores con diferente letra minúscula son estadísticamente diferentes, según la prueba no paramétrica de Wilcoxon-Kruskal-Wallis.

Cuadro 13. Promedios de las variables de severidad y morfologías por la inoculación de plantas de clavel con ocho cepas de hongos, cultivadas bajo invernadero en Montecillo, México, del 1 de abril al 15 de mayo durante el 2018.

CEPAS	VARIABLES									
	SEP	SIT	PM(%)	LTP	GT	NT	NE	NB	NF	AF
<i>Fusarium oxysporum</i> (Cepa 1)	1.75 a	2.05 a	25 a	7.80 a	0.40 a	2.60 d	15.85 a	0.50 a	0.20 a	84.41 a
<i>Fusarium culmorum</i> (Cepa 2)	0.80 b	0.95 b	5 c	7.78 a	0.40 a	4.40 b	19.60 a	0.70 a	0.45 a	136 a
<i>Rhizoctonia sp.</i> (Cepa 3)	0.75 b	0.70 c	5 c	7.35 a	0.39 a	4.15 b	18.40 a	1.10 a	0.50 a	112.5 a
<i>Cephalosporium sp.</i> (Cepa 4)	0.95 b	1.10 b	5 c	6.20 a	0.37 a	3.70 c	21.45 a	0.90 a	0.20 a	141.6 a
<i>Fusarium culmorum</i> (Cepa 5)	1.00 b	0.85 b	5 c	7.25 a	0.37 a	3.40 c	19.90 a	0.65 a	0.30 a	130.0 a
<i>Fusarium culmorum</i> (Cepa 6)	0.45 c	0.40 d	0 c	7.55 a	0.37 a	4.80 a	25.05 a	1.60 a	0.55 a	98.7 a
<i>Fusarium culmorum</i> (Cepa 7)	1.35 a	1.25 b	10 b	6.40 a	0.38 a	3.20 c	21.90 a	0.65 a	0.40 a	103 a
<i>Fusarium oxysporum</i> (Cepa 8)	1.50 a	1.20 b	15 b	7.38 a	0.38 a	3.35 c	22.50 a	1.20 a	0.35 a	96.8 a
Testigo	0.05 d	0.30 e	0 c	6.90 a	0.42 a	4.30 b	23.75 a	1.35 a	0.15 a	123 a
Pr > Chi-cuadrado	*	*	*	NS	NS	**	NS	NS	NS	NS
N	20	20		20	20	20	20	20	20	20

N: Número de observaciones; SEP: Severidad externa de la planta; SIT: Severidad interna del tallo; PM: Plantas muertas LTP: Longitud de tallo principal (cm), GT: Grosor de tallo (cm); NT: Numero de tallo; NE: Numero de entrenudos; NB: Numero de botones; NB: Numero de flores; AF: Área foliar (cm²); Pr > Chi – cuadrado: indica el valor estadístico de significancia. Valores seguidos por el símbolo (*) indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$), y valores seguidos por el símbolo (**) indican diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$), NS; No hay diferencia significativa; Valores con diferente letra minúscula son estadísticamente diferentes, según la prueba no paramétrica de Wilcoxon-Kruskal-Wallis.

Cuadro 14. Promedio de biomasa seca por órgano vegetal y variables fisiológicas de los tratamientos en plantas de clavel, cultivadas bajo invernadero en Montecillo, México, del 1 de abril al 15 de mayo durante el 2018.

TRATAMIENTOS	VARIABLES									
	BSR	BST	BSH	BSB	BSF	BSTota	F	C	TH	T
Rojo fuego Fo. (T1)	200 b	600 a	1120 c	0 e	0 d	1920 b	27.96 a	0.18 a	36.20 a	0.01 a
Rojo fuego Fc. (T2)	220 b	580 a	1680 b	0 e	0 d	2480 b	-	-	-	-
Rojo fuego R. (T3)	240 b	620 a	1520 b	20 e	160 b	2560 b	-	-	-	-
Rojo fuego C. (T4)	140 c	290 b	860 c	0 e	0 d	1290 c	-	-	-	-
Rojo fuego Fe. (T5)	200 b	580 a	1060 c	10 e	160 b	2010 b	-	-	-	-
Rojo fuego Fc. (T6)	260 b	700 a	1780 b	60 d	0 d	2800 b	-	-	-	-
Rojo fuego Fc. (T7)	140 c	360 b	1100 c	0 e	0 d	1600 c	-	-	-	-
Rojo fuego Fo.(T8)	200 b	700 a	1520 b	40 d	160 b	2620 b	-	-	-	-
Rojo fuego T. (T9)	200 b	380 b	1260 c	0 e	0 d	1840 b	29.90 a	0.23 a	35.11 a	0.01 a
Camile pink Fo. (T10)	80 d	80 c	160 d	0 e	0 d	320 e	-	-	-	-
Camile pink Fc. (T11)	100 c	100 c	660 c	50 d	220 a	1130 d	-	-	-	-
Camile pink R. (T12)	110 c	110 c	600 d	120 b	140 b	1080 d	-	-	-	-
Camile pink C. (T13)	150 c	150 c	720 c	210 a	20 d	1250 c	-	-	-	-
Camile pink Fe. (T14)	190 b	190 c	540 d	70 d	140 b	1130 d	-	-	-	-
Camile pink Fc. (T15)	120 c	120 c	780 c	70 d	200 a	1290 c	-	-	-	-
Camile pink Fc. (T16)	200 b	200 c	420 d	80 d	80 b	980 d	-	-	-	-
Camile pink Fo. (T17)	70 d	90 c	170 d	110 b	0 d	440 e	-	-	-	-
Camile pink T. (T18)	140 c	140 c	700 c	100 b	40 c	1120 d	-	-	-	-
Ariel Fo. (T19)	100 d	220 c	700 c	10 e	60 c	1090 d	-	-	-	-
Ariel Fc. (T20)	100 d	260 b	940 c	60 d	80 b	1440 c	-	-	-	-
Ariel R. (T21)	140 c	160 c	800 c	80 d	60 c	1240 c	-	-	-	-
Ariel C. (T22)	140 c	320 b	1300 b	0 e	0 d	1760 b	-	-	-	-
Ariel Fe. (T23)	160 c	640 a	1300 b	0 e	80 b	2180 b	-	-	-	-
Ariel Fc. (T24)	120 c	180 c	880 c	140 b	260 a	1580 c	-	-	-	-
Ariel Fc. (T25)	110 c	110 c	1280 b	20 e	40 c	1560 c	-	-	-	-
Ariel Fo. (T26)	90 d	340 b	860 c	110 b	240 a	1640 c	-	-	-	-
Ariel T. (T27)	120 c	440 b	680 c	180 b	0 d	1420 c	-	-	-	-
Sumerdress Fo. (T28)	140 c	340 b	1420 b	40 d	20 d	1960 b	34.63 a	0.22 a	34.59 a	0.01 a

Sumerdress Fc. (T29)	200 b	500 a	1880 b	10 e	80 c	2700 b	-	-	-	-
Sumerdress R. (T30)	180 b	540 a	1960 a	0 e	120 b	2800 b	-	-	-	-
Sumerdress C. (T31)	200 b	540 a	2120 a	60 c	80 b	3000 a	-	-	-	-
Sumerdress Fe. (T32)	160 c	300 b	1640 b	40 d	0 d	2140 b	-	-	-	-
Sumerdress Fc. (T33)	200 b	360 b	1080 c	110 b	100 b	1850 b	-	-	-	-
Sumerdress Fc. (T34)	140 c	480 b	1840 b	20 e	90 b	2570 b	-	-	-	-
Sumerdress Fo. (T35)	220 b	340 b	1820 b	80 c	80 b	2540 b	-	-	-	-
Sumerdress T. (T36)	360 a	680 a	2180 a	90 c	50 c	3360 a	31.98 a	0.22 a	35.15 a	0.01 a
Pr > Chi-cuadrado	**	**	**	**	**	**	NS	NS	NS	NS
N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

N: Número de observaciones; T: tratamiento Biomasa seca (BS, mg) de R: raíz; T: tallo; H: hoja; B: Botones florales; Total: total; F: Tasa de fotosíntesis neta ($\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); C: Conductancia estomática ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); TH: Temperatura de la hoja ($^{\circ}\text{C}$); T: Transpiración ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); Fo: *Fusarium oxysporum*, Fc: *Fusarium culmorum*, R: *Rhizoctonia sp.* C: *Cephalosporium sp.*, Fe (*Fusarium equiseti*) T: Testigo; Pr > Chi – cuadrado: indica el valor estadístico de significancia; Valores seguidos por el símbolo (**) indican diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$). NS; No hay diferencia significativa; Valores con diferente letra minúscula son estadísticamente diferentes, según la prueba no paramétrica de Wilcoxon-Kruskal-Wallis.

Cuadro 15. Promedios de las variables severidad y morfológicas de los tratamientos en plantas de clavel, cultivadas bajo invernadero en Montecillo, México, del 1 de abril al 15 de mayo durante el 2018.

TRATAMIENTOS	VARIABLES									
	SEP	SIT	PM(%)	LTP	GT	NT	NE	NB	NF	AF
Rojo fuego Fo. (T1)	0.4 c	1.2 c	0 e	17.20 a	0.48 a	1.60 c	12.20 c	0.00 d	0.00 d	117.80 b
Rojo fuego Fc. (T2)	1.4 b	1.8 b	0 e	14.70 a	0.44 b	3.80 b	15.40 c	0.00 d	0.00 d	143.20 b
Rojo fuego R. (T3)	1.2 c	0.8 c	0 e	15.20 a	0.44 b	4.00 a	17.60 c	0.20 d	0.20 c	105.80 b
Rojo fuego C. (T4)	1.8 b	1.8 b	20 d	9.60 b	0.40 c	1.40 c	7.80 d	0.00 d	0.00 d	105.00 b
Rojo fuego Fe. (T5)	1.6 b	1.4 b	0 e	15.00 a	0.48 a	2.20 c	17.00 c	0.20 d	0.20 c	139.00 b
Rojo fuego Fc. (T6)	0.2 c	0.2 c	0 e	15.40 a	0.44 b	4.00 a	14.20 c	0.80 c	0.00 d	137.60 b
Rojo fuego Fc. (T7)	1 c	1.2 c	0 e	11.20 b	0.48 a	1.80 c	12.20 c	0.00 d	0.00 d	94.40 c
Rojo fuego Fo. (T8)	0.4 c	0.2 c	0 e	15.70 a	0.46 b	3.20 b	19.00 c	0.40 d	0.20 c	132.20 b
Rojo fuego T. (T9)	0 c	1 c	0 e	11.80 b	0.46 b	2.80 b	11.60 c	0.00 d	0.00 d	125.00 b
Camile pink Fo. (T10)	4 a	5 a	100 a	2.00 d	0.40 c	1.00 c	7.00 d	0.00 d	0.00 d	13.40 d
Camile pink Fc. (T11)	0.4 c	0.4 c	0 e	2.00 d	0.42 c	4.40 a	11.60 c	1.00 c	0.80 b	64.13 c
Camile pink R. (T12)	1 c	1 c	20 d	5.00 c	0.36 d	4.00 a	7.40 d	1.20 c	1.00 a	57.32 c
Camile pink C. (T13)	0.2 c	0.2 c	0 e	3.60 d	0.36 d	4.00 a	18.20 c	2.60 a	0.20 c	74.80 c
Camile pink Fe. (T14)	1 c	1 c	20 d	3.40 d	0.34 e	3.00 b	9.80 d	1.00 c	0.60 b	40.16 d
Camile pink Fc. (T15)	0.4 c	0.4 c	0 e	3.20 d	0.32 e	4.60 a	13.80 c	1.20 c	0.80 b	68.54 c
Camile pink Fc. (T16)	1.8 b	2 b	40 c	4.00 d	0.36 d	2.80 b	11.20 d	1.60 b	0.60 b	30.30 d
Camile pink Fo. (T17)	3.4 a	4 a	60 b	3.20 d	0.36 d	1.60 c	8.00 d	0.80 c	0.00 d	17.20 d
Camile pink T. (T18)	0.2 c	0 c	0 e	2.00 d	0.40 c	4.80 a	20.60 b	2.20 a	0.20 c	70.20 c
Ariel Fo. (T19)	1.8 b	1.2 c	0 e	4.80 c	0.40 c	4.40 a	11.60 c	0.20 d	0.60 b	74.00 c
Ariel Fc. (T20)	0.8 c	1 c	0 e	4.60 c	0.42 c	4.80 a	14.20 c	1.20 c	0.60 b	119.38 b
Ariel R. (T21)	0.8 c	0.6 c	0 e	5.60 c	0.36 d	4.80 a	13.00 c	2.20 a	0.40 c	81.60 c
Ariel C. (T22)	1.4 b	1 c	0 e	4.00 c	0.36 d	5.40 a	18.80 b	0.00 d	0.00 d	146.40 b
Ariel Fe. (T23)	0.8 c	0.4 c	0 e	6.00 c	0.34 e	5.60 a	32.20 b	0.00 d	0.40 c	142.80 b
Ariel Fc. (T24)	1 c	0.6 c	0 e	5.40 c	0.32 f	5.60 a	38.20 a	2.40 a	0.80 b	65.24 c
Ariel Fc. (T25)	1.8 b	0.6 c	0 e	4.60 c	0.36 d	4.40 a	42.40 a	0.40 d	0.40 c	113.94 c
Ariel Fo. (T26)	1.4 b	0.4 c	0 e	5.40 c	0.36 d	4.40 a	30.00 b	2.20 a	0.80 b	68.71 c
Ariel T. (T27)	0 c	0 c	0 e	4.20 c	0.40 c	4.60 a	32.80 b	2.00 b	0.00 d	55.70 c
Summerdress Fo. (T28)	0.8 c	0.8 c	0 e	7.40 b	0.30 f	3.40 b	32.60 b	1.80 b	0.20 c	132.43 b

Summerdress Fc. (T29)	0.6 c	0.6 c	0 e	5.80 c	0.30 f	4.60 a	37.20 a	0.60 d	0.40 c	213.60 a
Summerdress R. (T30)	0 c	0.4 c	0 e	6.60 b	0.40 c	3.80 b	35.60 a	0.80 c	0.40 c	204.80 a
Summerdress C. (T31)	0.4 c	1.4 b	0 e	5.80 c	0.34 e	4.00 a	41.00 a	1.00 c	0.60 b	240.40 a
Summerdress Fe. (T32)	0.6 c	0.6 c	0 e	5.40 c	0.30 f	2.80 b	20.60 c	1.40 c	0.00 d	198.20 a
Summerdress Fc. (T33)	0.2 c	0.4 c	0 e	6.20 c	0.38 d	5.00 a	34.00 a	2.00 b	0.60 b	117.60 b
Summerdress Fc. (T34)	0.8 c	1.2 b	0 e	5.80 c	0.30 f	3.80 b	21.8.00 c	0.60 d	0.60 b	171.20 b
Summerdress Fo. (T35)	0.8 c	0.2 c	0 e	6.40 b	0.32 f	4.20 a	33.00 b	1.40 c	0.40 c	163.51 b
Summerdress T. (T36)	0 c	0.2 c	0 e	6.80 b	0.40 c	5.00 a	30.00 b	1.20 d	0.40 c	240.77 a
Pr > Chi-cuadrado	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

N: Número de observaciones; SEP: Severidad externa de la planta; SIT: Severidad interna del tallo; LTP: Longitud de tallo principal (cm), GT: Grosor de tallo (cm); NT: Numero de tallo; NE: Numero de entrenudos; NB: Numero de botones; NB: Numero de flores; AF: Área foliar (cm²); Fo: *Fusarium oxysporum*, Fc: *Fusarium culmorum*, R: *Rhizoctonia sp.* C: *Cephalosporium sp.*, Fe (*Fusarium equiseti*) T: Testigo; Pr > Chi – cuadrado: indica el valor estadístico de significancia. El símbolo (**) indican diferencias altamente significativas (P ≤ 0.01), Valores con diferente letra minúscula son estadísticamente diferentes, según la prueba no paramétrica de Wilcoxon-Kruskal-Wallis.

3.5 Respuesta de genotipos de clavel a *Fusarium oxysporum*

La temperatura promedio durante los 45 días que las plantas permanecieron en el invernadero fue 20.7 °C, valor que se encuentra en los rangos óptimos para la producción de clavel entre 20 a 24 °C (Besemer, 1988) y de desarrollo del patógeno entre 14 a 23 °C (Agrios, 2005; Allen y Lenné, 1998; Carrillo, 2003). La humedad relativa fue en promedio de 54 % esta fue menor a la humedad relativa óptima que oscila entre 60 a 70% (Rosauero, 1983).

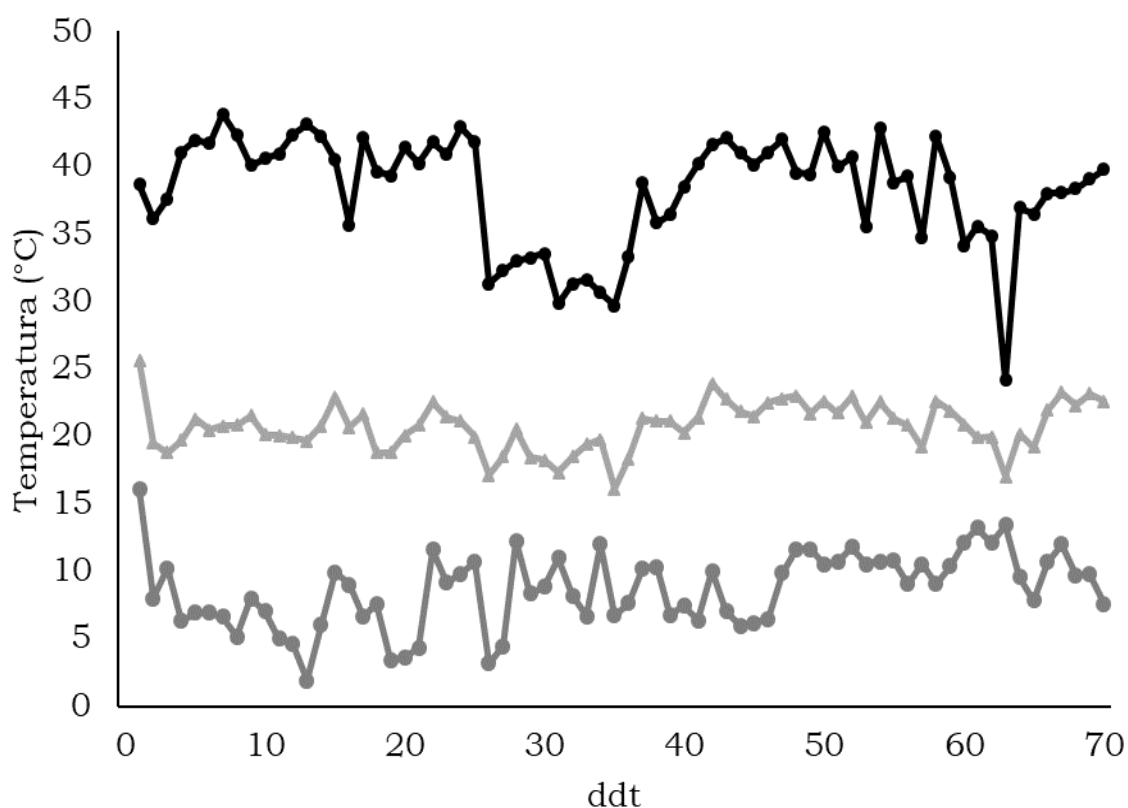


Figura 6. Temperaturas máximas, mínimas, y promedio de los 70 ddt hasta el muestreo destructivo en tres cultivares de clavel en Motecillo, Texcoco, Estado de México del 9 de diciembre 2017 al 9 de abril 2018.

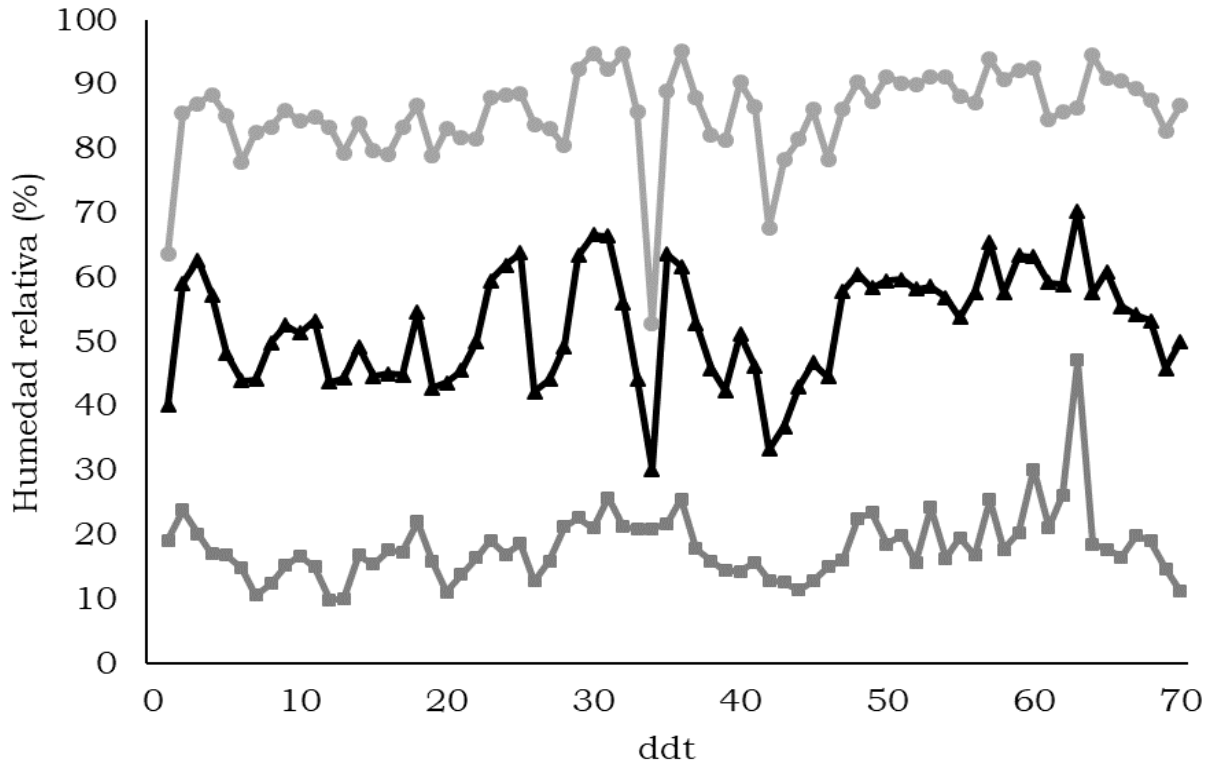


Figura 7. Humedad relativa promedio de los 70 ddt hasta el muestreo destructivo en tres cultivares de clavel en Motecillo, Texcoco, Estado de México del 9 de diciembre 2017 al 9 de abril 2018.

Las variables fisiológicas, morfológicas y de severidad de la infección fueron estadísticamente similares entre cultivares (Información no presentada) (Pr Chi-cuadrado < 0.05) a excepción de la variable PM que fue mayor en el cultivar Camile pink en 37.5 % (P 0.0037) (Cuadros 16 y 17).

Las plantas inoculadas con la cepa 1 de *F. oxysporum* L. presentaron menores valores en la mayoría de los tres tipos de variables ($P \leq 0.05$) (Cuadros 16 y 17); en BSR fue de 55 %, BST de 96 %, BSH de 52 %, BSB de 77 % y BSTotal de 55 % (Cuadro 16). Esto coincide con los resultados de otros autores que encontraron menor desarrollo de la planta por efecto del patógeno (Arbeláez *et al.*, 1993; Arbeláez, 1987; 1992). A diferencia de lo anterior, el valor de BSF fue igual entre plantas con o sin inóculo.

De acuerdo a los resultados de la variable SEP las plantas inoculadas presentaron en promedio síntomas en el tercio medio de la planta, y valores de SIT de los tallos que indican pudrición de hasta un 1 cm, mientras que las plantas testigo no fueron dañadas de acuerdo con las escalas medidas (Cuadro 17). Las plantas inoculadas presentaron un 25 % de mortandad. Las plantas de clavel inoculadas con *F. oxysporum* L. presentaron menores valores en la LTP de 33 %, el NT de 42 %, el NE de 42 %, el NB de 35 %, y el AF de 45 %, pero no se observaron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en GT y NT entre las plantas con o sin inoculación. Las características fisiológicas, morfológicas y el nivel de severidad fueron estadísticamente similares entre los cuatro cultivares (promedio de los dos niveles de inoculación). (Cuadro 17).

Los valores menores de biomasa seca de los diferentes órganos de la planta infectada, así como de LTP, NT, NE, NB y AF se debe a que el patógeno coloniza el xilema y disminuye el movimiento de agua y nutrientes y eventualmente puede provocar marchitez y muerte (Arbeláez et al., 1993; Burgess et al., 2008). La planta a su vez, produce compuestos fenólicos y tiosoles que tornan el tejido vascular de color café, y esto permite evidenciar la presencia de la enfermedad cuando se corta el tallo.

La F, C, T y TH presentaron una respuesta similar con o sin inóculo (Cuadro 18). Lo que puede explicarse porque el patógeno no invadió directamente a la hoja, por lo que éstas realizan el proceso fotosintético normal, pero si disminuye el área foliar (Cuadro 19).

Lo que podría estar causado que esto suceda, la metodología empleada para medir las variables de fotosíntesis neta, conductancia estomática, transpiración, y temperatura no sea la más adecuada para este tipo de experimentos, ya que solo se midió una solo hoja del segundo nudo y se sabe que este tipo de

variables pueden variar de acuerdo a la posición de la hoja, lo que sugiere que para posteriores estudios será importante medir esta variable con una cámara que permita medir estas variables en la planta completa.

Cuadro 16. Promedio de biomasa seca por órgano vegetal y variables fisiológicas por la inoculación de plantas de clavel con ocho cepas de hongos, cultivadas bajo invernadero en Montecillo, México, del 1 de abril al 15 de mayo durante el 2018.

CULTIVARES	VARIABLES									
	BSR	BST	BSH	BSB	BSF	BSTotal	F	C	TH	T
Durcal	240 a	350 a	900 a	180 a	60 a	1750 a	18.47 a	0.35 a	33.34 a	0.01 a
Bien fait	210 a	460 a	1100 a	160 a	80 a	2040 a	22.26 a	0.41 a	33.86 a	0.02 a
Briguette	170 a	500 a	1230 a	100 a	40 a	2060 a	21.38 a	0.40 a	33.43 a	0.02 a
Camile pink	200 a	340 a	890 a	90 a	60 a	1590 a	23.79 a	0.43 a	33.63 a	0.02 a
Pr > Chi-cuadrado	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
N	16	16	16	16	16	16	10	10	10	10

N: Número de observaciones; Biomasa seca (BS, mg) de R: raíz; T: tallo; H: hoja; B: Botones florales; Total: total; F: Fotosíntesis (mol CO₂ m⁻² s⁻¹); C: Conductancia (mol H₂O m⁻² s⁻¹); TH: Temperatura de la hoja (°C); T: Transpiración (mol m⁻² s⁻¹); Pr > Chi – cuadrado: indica el valor estadístico de significancia. Valores con la misma letra minúscula nos son estadísticamente diferentes, según la prueba no paramétrica de Wilcoxon-Kruskal-Wallis.

Cuadro 17. Promedios de las variables de severidad y morfológicas por la inoculación de plantas de clavel con ocho cepas de hongos, cultivadas bajo invernadero en Montecillo, México, del 1 de abril al 15 de mayo durante el 2018.

CULTIVARES	VARIABLES									
	SEP	SIT	PM(%)	LTP	GT	NT	NE	NB	NF	AF
Durcal	0.87 a	1.18 a	0	5.87 a	0.28 a	4.31 a	19.87 a	2.18 a	0.62 a	113.81 a
Bien fait	0.93 a	0.87 a	0	5.56 a	0.27 a	4.81 a	22.56 a	2.62 a	0.62 a	115.17 a
Briguette	1.12 a	1.25 a	12.5	4.87 a	0.26 a	4.00 a	25.09 a	1.43 a	0.43 a	128.43 a
Camile pink	1.93 a	2.18 a	37.5	4.93 a	0.25 a	3.93 a	22.62 a	0.50 a	0.37 a	90.11 a
Pr > Chi-cuadrado	NS	NS	**	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
N	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16

N: Número de observaciones; SEP: Severidad externa de la planta; SIT: Severidad interna del tallo; PM: Plantas muertas; LTP: Longitud de tallo principal (cm), GT: Grosor de tallo (cm); NT: Numero de tallo; NE: Numero de entrenudos; NB: Numero de botones; NF: Numero de flores; AF: Área foliar (cm²); Pr>Chi-cuadrado: indica el valor estadístico de significancia; Valores con la misma letra minúscula nos son estadísticamente diferentes, según la prueba no paramétrica de Wilcoxon-Kruskal-Wallis.

Cuadro 18. Promedio de biomasa seca por órgano vegetal y variables fisiológicas por dos inoculaciones en plantas de clavel, cultivadas bajo invernadero en Montecillo, México, del 1 de abril al 15 de mayo durante el 2018.

INOCULACIÓN	VARIABLES									
	BSR	BST	BSH	BSB	BSF	BSTotal	F	C	TH	T
CON	131 b	250 b	670 b	50 b	57a	1170 b	20.00 a	0.41 a	33.61 a	0.02 a
SIN	290 a	5750 a	1390 a	220 a	75 a	2550 a	22.24 a	0.39 a	33.54 a	0.02 a
Reducción (%)	55	96	52	77	-	55	-	-	-	-
Pr > Chi-cuadrado	**	**	**	*	NS	**	NS	NS	NS	NS
N	32	32	32	32	32	32	20	20	20	20

N: Número de observaciones; Biomasa seca (BS, mg) de R: raíz; T: tallo; H: hoja; B: Botones florales; Total: biomasa total; F: Tasa de fotosíntesis neta ($\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); C: Conductancia estomática ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); TH: Temperatura de la hoja ($^{\circ}\text{C}$); T: Transpiración ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); Pr > Chi – cuadrado: indica el valor estadístico de significancia. Valores seguidos por el símbolo (*) indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$), y valores seguidos por el símbolo (**) indican diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$). Valores con diferente letra minúscula por columna son estadísticamente diferentes, según la prueba no paramétrica de Wilcoxon-Kruskal-Wallis.

Cuadro 19. Promedios de las variables de severidad y morfologías por dos inoculaciones en plantas de clavel, cultivadas bajo invernadero en Montecillo, México, del 1 de abril al 15 de mayo durante el 2018.

INOCULACIÓN	VARIABLES									
	SEP	SIT	PM(%)	LTP	GT	NT	NE	NB	NF	AF
CON	2.25 a	2.56 a	25 a	4.25 b	0.25 a	16.53 b	16.53 b	25.53 b	0.56 a	79.83 b
SIN	0.18 b	0.18 b	0 b	6.37 a	0.27 a	28.50 a	28.50 a	39.46 a	0.46 a	143.93 a
Reducción(%)	-	-	-	33	-	42	42	35	-	45
Pr >Chi cuadrado	**	**	**	**	NS	**	**	NS	NS	**
N	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32

N: Número de observaciones; SEP: Severidad externa de la infección en la planta provocada por *Fusarium oxysporum*; SIT: severidad interna de la infección de tallo provocada por *Fusarium oxysporum*; LTP: Longitud de tallo principal (cm), GT: Grosor de tallo (cm); NT: Número de tallos; NE: Número de entrenudos; NB: Número de botones florales; NF: Número de flores; AF: Área foliar por planta (cm²); Pr > Chi – cuadrado: indica el valor estadístico de significancia. El símbolo (**) indican diferencias altamente significativas (P ≤ 0.01), (NS) no hay diferencias significativas. Valores con diferente letra minúscula por columna son estadísticamente diferentes, según la prueba no paramétrica de Wilcoxon-Kruskal-Wallis.

Cuadro 20. Promedio de biomasa seca por órgano vegetal y variables fisiológicas de los tratamientos en plantas de clavel, cultivadas bajo invernadero en Montecillo, México, del 1 de abril al 15 de mayo durante el 2018.

TRATAMIENTO	VARIABLES									
	BSR	BST	BSH	BSB	BSF	BSTotal	F	C	TH	T
T1 Durcal/Inoculado	200 b	26 d	70 c	30 d	100 a	1300 c	17.67 a	0.35 a	33.56 a	0.01 a
T2 Durcal/Testigo	280 a	450 c	1100 b	330 a	30 a	2200 b	19.26 a	0.34 a	33.13 a	0.01 a
T3 Bien fait/Inoculado	150 c	300 d	800 c	50 c	30 a	1330 c	21.72 a	0.44 a	33.55 a	0.02 a
T4 Bien fait/Testigo	280 a	620 a	1410 a	280 b	130 a	2750 a	22.81.a	0.38 a	34.16 a	0.02 a
T5 Brigquette/Inoculado	90 d	320 d	860 c	80 c	40 a	1400 c	22.93 a	0.52 a	34.02 a	0.02 a
T6 Brigquette/Testigo	260 a	670 a	1610 a	130 c	50 a	2730 a	20.45 a	0.34 a	33.07 a	0.01 a
T7 Camile p./Inoculado	70 d	140 e	330 d	30 d	50 a	640 d	17.16 a	0.29 a	33.24 a	0.01 a
T8 Camile p./Testigo	320 a	550 b	1450 a	140 c	70 a	2540 a	26.44 a	0.49 a	33.79 a	0.02 a
Pr > Chi-cuadrado	**	**	**	**	NS	**	NS	NS	NS	NS
N	8	8	8	8	8	8	5	5	5	5

N: Número de observaciones; Biomasa seca (BS, mg) de R: raíz; T: tallo; H: hoja; B: Botones florales; Total: total; F: Tasa de fotosíntesis neta ($\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); C: Conductancia estomática ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); TH: Temperatura de la hoja ($^{\circ}\text{C}$); T: Transpiración ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); Pr > Chi – cuadrado: indica el valor estadístico de significancia. El símbolo (**) indican diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$), (NS) no hay diferencia significativa. Valores con diferente letra minúscula por columna son estadísticamente diferentes, según la prueba no paramétrica de Wilcoxon-Kruskal-Wallis.

Cuadro 21. Promedios de las variables severidad y morfológicas de los tratamientos en plantas de clavel, cultivadas bajo invernadero en Montecillo, México, del 1 de abril al 15 de mayo durante el 2018.

TRATAMIENTO	VARIABLES									
	SEP	SIT	PM(%)	LTP	GT	NT	NE	NB	NF	AF
T1 Durcal Inoculado	1.62 b	1.85 c	0 c	4.62 b	0.26 a	3.62 c	15.5 d	0.37 d	0.75 a	96.00 c
T2 Durcal Testigo	0.12 c	0.50 d	0 c	7.12 a	0.30 a	5.00 b	24.25 c	4.00 a	0.50 a	131.62 b
T3 Bien fait inoculado	1.75 b	1.75 c	0 c	4.50 b	0.26 a	3.87 c	16.50 d	1.00 c	0.62 a	93.87 c
T4 Bien fait Testigo	0.12 c	0.00 e	0 c	6.62 a	0.28 a	5.75 a	28.62 b	4.25 b	0.62 a	136.47 b
T5 Briguette inoculado	2.00 b	2.37 b	25 b	4.00 c	0.25 a	3.12 d	23.25 c	1.00 c	0.50 a	89.25 c
T6 Briguette Testigo	0.25 c	0.12 e	0 c	5.75 a	0.27 a	4.87 b	26.75 b	1.87 c	0.37 a	167.62 a
T7 Camile p. Inoculado	3.62 a	4.25 a	75 a	3.87 c	0.25 a	3.00 c	10.87 e	0.00 e	0.37 a	40.22 d
T8 Camile p. Testigo	0.25 c	0.12 e	0 c	6.00 c	0.25 a	4.87 b	34.37 a	1.00 c	0.37 a	140.00 b
PR> Chi-cuadrada	**	**	**	**	NS	**	**	**	NS	**
N	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8

N: Número de observaciones; SEP: Severidad externa de la infección en la planta provocada por *Fusarium oxysporum*; SIT: severidad interna de la infección de tallo provocada por *Fusarium oxysporum*; LTP: Longitud de tallo principal (cm), GT: Grosor de tallo (cm); NT: Número de tallos; NE: Número de entrenudos; NB: Número de botones florales; NF: Número de flores; AF: Área foliar (cm²); Pr > Chi – cuadrado: indica el valor estadístico de significancia. El símbolo (**) indican diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$), (NS) no hay diferencia significativa. Valores con diferente letra minúscula por columna son estadísticamente diferentes, según la prueba no paramétrica de Wilcoxon-Kruskal-Wallis.

Los tratamientos (la interacción de variedad y nivel de inoculación) de plantas inoculadas con *Fusarium oxysporum* presentaron menor biomasa seca en comparación con las plantas sin inoculación (testigos); el nivel en que la biomasa seca fue menor dependió del cultivar.

La acumulación de biomasa seca fue menor en raíz de 28 % en el cultivar Durcal a 78 % en el cultivar Camile pink, en tallo de 52 % en el cultivar Bien fait hasta 95 % en el cultivar Durcal, mientras que en hoja fue de 44 % en el cultivar Bien fait a 94 % en Durcal; en botones florales la menor biomasa seca fue de 38 % en el cultivar Brigquette hasta 91 % en Durcal, y en la biomasa seca por planta fue de 49 % en el cultivar Brigquette a 74% en el cultivar Camile pink (Cuadro 20). A diferencia de lo observado en las variables anteriores, en biomasa seca de flores se observó una respuesta similar entre las plantas por cultivar de los tratamientos con y sin inoculación.

El cultivar que presentó el mayor grado SEP y SIT fue el cultivar Camile pink, mientras que los cultivares que presentaron los menores valores de estas variables fueron Bien fait y Brigquette. La longitud de tallo fue de 30 a 35 % menor en los cultivares inoculados con *Fusarium oxysporum* con respecto a los cultivares sin inocular; también fue menor el número de tallos de 27 a 38 %, el número de entrenudos de 13 % para el cultivar Brigquette a 68 % Bien fait, el número de botones florales de 47 % para Brigquette a 100 % para Camile pink, y el área foliar de 27 % para el cultivar Durcal a 71 % para el cultivar Camile pink. Las variables grosor de tallo y número de flores presentaron una respuesta similar entre tratamientos (Cuadro 21).

Con los resultados anteriores se observa que el cultivar con el menor grado de resistencia es Camile pink pues presentó la mayor severidad de daño, así como el mayor porcentaje de plantas muertas, menor biomasa seca por órgano y de la

planta completa, menor longitud de tallo, menor número de tallos, menor número de entrenudos y menor área foliar por planta en comparación con los otros cultivares, mientras que Bein fait es el cultivar que presentó el mayor grado de resistencia de acuerdo con las variables medidas.

Aunque el cultivar Durcal no presentó un grado alto de SEP y SIT, ni mortandad, sí presentó valores bajos de BST, BSH, BSB y BSTotal; eso puede deberse a la zona en el que patógeno coloniza la planta, al afectar los haces vasculares.

La resistencia a *Fusarium oxysporum* en el clavel se ha relacionado con el color floral; entre más claro es el color de los pétalos, mayor es la susceptibilidad (Soto *et al.*, 2009). Camile pink con pétalos de color blanco y jaspeado rojo fue la más susceptible de los cultivares evaluados. Una hipótesis es que los genes que codifican para el color de la flor están asociados con genes de resistencia se encuentren físicamente dentro de un mismo cromosoma y además a distancias cercanas, asegurando que se segreguen juntos (Griffiths *et al.*, 2000).

La BST es la variable en donde se observa el mayor efecto de la infección por *Fusarium oxysporum* debido a que es el sitio donde ocurre la interacción entre la planta y el patógeno mientras que la raíz es el primer punto de contacto de la planta con el patógeno. Diversos estudios consideran que la ruta fenilpropanoide se presenta en el tallo en donde se generan bloques de construcción de estructuras de defensa (Baayen *et al.*, 1996), lignificación (Bayyen, 1988) y producción de metabolitos con actividad antifúngica y se considera que es la responsable de la activación de la respuesta de defensa del clavel.

La enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) ha sido objeto de estudio en el modelo de interacción entre el clavel y el patógeno considerando el efecto regulatorio que

puede presentar sobre la ruta fenilpropanoide. Se ha encontrado que elicitores de origen fúngico estimulan la inducción de la actividad enzimática en el tallo (Ardila *et al.*, 2011), mientras que otros estudios han demostrado que como resultado de la interacción con el patógeno se presentan cambios en la acumulación de metabolitos, producto de dicha ruta sobre todo en la raíz (Ardila *et al.*, 2011).

Nuestras observaciones del nivel de severidad del daño en la planta confirman que la inoculación con *Fusarium oxysporum* provoca los síntomas descritos por diversos autores como son el amarillamiento general de la planta en sentido ascendente, secamiento de la corteza, necrosis rojiza de los haces vasculares que se extiende desde las raíces; además, en estados avanzados de daño se ha observado el ahuecado el tallo y finalmente destrucción del mismo (Agrios, 2005; Allen y Lenné, 1998; Arbeláez *et al.*, 1993). Las lesiones pueden presentarse en tallos jóvenes, y eventualmente se tornan de color oscuro de café a negro, lo cual coincide con la muerte de la planta (Allen y Lenné, 1998; Arbeláez *et al.*, 1993).

Se han detectado en tallo la presencia de mecanismos de regulación postranscripcional, que pueden actuar en la planta para generar enzimas activas como la fenilamina amonio liasa, peroxidasa, polifenoloxidasa y ser determinantes, por tanto, en la defensa de la planta de clavel (Ardila *et al.*, 2011).

Por otro lado, es posible la presencia de agentes supresores de la respuesta vegetal, usados por el patógeno durante el proceso infectivo para colonizar los tejidos de la planta susceptible. (Ardila *et al.*, 2011).

3.6 Prueba molecular

Tomando en cuenta los resultados de la prueba de patogenicidad de la Cepa 1 (*Fusarium oxysporum*) con mayor patogenicidad y que se confirmó molecularmente con la metodología descrita en el apartado 3.9 con los genes la región del espacio transcrito interno (ITS) del ADN ribosomal y el gene del factor de elongación (TEF) de la traducción *1a(TEF)* para *Fusarium* presentando ITS un 99.9 % de similitud con *Fusarium oxysporum* siendo la secuencia más cercana “MH782044” y TEF un 99.9 % de similitud con *Fusarium oxysporum* siendo la secuencia más cercana “MG196641”. Para la región del ITS = con los iniciadores ITS5/ITS4 (White et al., 1990). Para la secuencia parcial del gen TEF = con los iniciadores EF1/EF2 (O'Donnell et al., 1989).

V. CONCLUSIÓN

Fusarium oxysporum y *culmoron* son las cepas con mayor concurrencia en clavel.

Fusarium oxysporum (Cepa 1) y *Fusarium culmorum* (Cepa 2) estas dos cepas, provocaron la mayor mayor patogenicidad.

La capacidad de hongo de ser patogénico o no, en la planta de clavel, depende del genotipo, de acuerdo a los hongos evaluados bajo el ambiente descrito.

La infestación *Fusarium oxysporum* causó menor biomasa seca de los distintos órganos vegetales, así como de algunas variables morfológicas como la longitud del tallo principal, el número de tallos, entrenudos, botones florales y área foliar, lo cual depende del cultivar.

El cultivar de clavel más susceptible a *Fusarium oxysporum* fue Camile pink mientras que la más resistente es Bien fait en las condiciones en las que se realizó el experimento.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Armstrong, G. M., and J. K. Armstrong. 1981. *Formae speciales and races of Fusarium oxysporum causing wilt diseases*. In *Fusarium: diseases, biology, and taxonomy*. Edited by P. E. Nelson, T. A. Toussoun, and R. J. Cook. Pennsylvania University Press, University Park, PA. pp. 391 -399.
- Abdel-Monaim M. F., K. A. M. Abo-Elyousr and K. M. Morsy (2011). Effectiveness of plant extracts on suppression of damping-off and wilt diseases of lupine (*Lupinus termis* Forsik). *Crop protection*. 30(2), 185-191.
<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.09.016>
- Agrios G. N. (2005) Fitopatología. *In: Enfermedades Ocasionadas por Ascomycetes y Hongos Imperfectos*. Massachusetts USA. pp 339-370.
- Arbeláez G. R y K. G. Torres (1987) Enfermedades fungosas y bacteriales del clavel en Colombia. *Agronomía Colombiana*.4:3-8.
<https://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/20913>.
- Arbeláez G. R. (1992) Avances en el manejo del marchitamiento vascular del clavel, ocasionado por *Fusarium oxysporum* f.sp. dianthi. *Agronomía Colombiana*. 2:1-8
<https://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/21166>
- Arbeláez, G. R., O.L. Calderón., F. Cevallos y D. Gonzalez (1993) Determinación de las razas fisiológicas de *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi del clavel en Colombia. *Fitopatología Colombiana*. 110(1): 19-27
<https://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/21227>
- Ardila, H. D., B. Baquero y S.T. Martínez (2011) Inducción de la actividad Fenilalanina Amonio Liasa en clavel (*Dianthus caryophyllus* L) por elicitores del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi raza 2. *Revista Colombiana de Química*. 36: 151-168
<https://revistas.unal.edu.co/index.php/rcolquim/article/view/23145/28>

- Baayen, R. P., G. B. Ouellette and D. Rioux (1996) Compartmentalization of decay in carnations resistant to *Fusarium oxysporum f. sp. dianthi*. *Phytopathology*. 86: 1018-1031. <https://doi.org/10.1094/phyto-86-1018>
- Baayen R. P (1988) Responses related to lignification and intravascular epiderm formation on carnations resistant to *Fusarium* wilt. *Canadian Journal of Botany*. 66: 784-792. <https://doi.org/10.1139/b88-115>
- Besmermer R. 1988. Introducción a la floricultura. Clavel. primera edición. 43-71 pag.
- (2004) Introducción a la floricultura Roy A. Larson (ed). In: Clavel. Universidad de Carolina del Norte USA. pp 43-71
- Booth, C. 1971. The genus *Fusarium*, Corn-monwealth Mycological. Institute. Kew, Surrey. England.
- Burgess, L., T. Knight., L. Tesoriero and H. Thuy (2008). Diagnostic manual for plant diseases in Vietnam. Characteristics of *Fusarium* wilt. centre for international agricultural research Australian. 126 – 144.
- Camacho L. M., C. R. Valenzuela y M. R. Hernández (2014) *Fusarium* spp. asociadas a clavel (*Dianthus caryophyllus L.*) en Baja California. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 8: 1409-1415 <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=263131168005>
- Camargo, O., C. Sanabria, G. Arbelaez y Ospina. 1994. Influencia del tipo de planta, respuesta del hospedante a la infección y tratamiento del suelo sobre la dinámica de la población de *Fusarium oxysporum f.sp. dianthi* en un suelo colombiano. *Agronomía Colombiana* 11: 118-130.
- Carrillo L. (2003). Los hongos de los alimentos y forrajes. *Fusarium*, morfología, cultivos, identificación, ambiente, micotoxinas: tricotecenos, zearalenona, fumosinas y otras toxinas. Universidad Nacional de Salta Argentina. pp 70 – 78.
- Connick, W. J., Daigle, D. J., Pepperman, A. B., Hebbbar, K. P., Lumsden, R.D., Anderson, T. W. y Sands, D. C. 1998. Preparation of stable,

granular formulations containing *Fusarium oxysporum* pathogenic to narcotic plants. *Biological control*. 13: 79- 84.

CBI (centro para la promoción de importaciones de países en desarrollo)

(2015), consultado el 3 enero 2017 <https://www.cbi.eu/market-information/cut-flowers-foilage/unspecialised-retail-market/>

Espinosa. M.A 1973. Estudios preliminares sobre marchitez y la pudrición del tallo de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) en Villa Guerrero, México. Tesis de Maestría, Colegio de Postgraduados, Chapingo México.

Farr. D.F., G.F. Bills., G.P. Chamuris and A.Y. Rossman, eds 1989. *Fungi on plants and plant products in United States*. APS PRESS: St. Paul. 1552 pp.

Garibaldi, A., and Pergola, G., 1975. Fusarium wilt resistance in carnation varieties and *Dianthus* species. *Med. Fac. Landbouwwv. Rijksuniv. Gent* 40: 545-554.

FAO. 2014. Organización de las Naciones Unidas Para la Alimentación y la Agricultura. Producción de tubérculos semilla libres de enfermedades. Recuperado el 8 de marzo de 2016.

García, J. M. D.; Shagarodsky, T.; Fresneda, J. A.; Fundora, Y. H., y González, J. 2007. Caracterización de especies del género *Fusarium* en el cultivo del garbanzo (*Cicer arietinum*) en las provincias ciudad Habana y La Habana. *Temas de Ciencia y Tecnología* 32 (11), 63–66.

García, E. 1981. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köpen. Tercera edición. Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 217 p.

García J. M., D.T. Shagarodsky., A. Fresneda., Y. H. Fundora y R. J. González (2007) Caracterización de especies del género *Fusarium* en el cultivo del garbanzo (*Cicer arietinum*) en las provincias ciudad Habana y La Habana. *Revista agrotecnia*. 32: 63-66. http://www.actaf.co.cu/revistas/agrotecnia_05_2008/agrot2005-1/DSEM54.pdf

- Garibaldi, A., F. Brunalli and M.L. Gullino. 1986 Suppression of Fusarium wilt of carnation by competitive non pathogenic strains of Fusaria. Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent 51/2b: 633
- Garibaldi, A. 1975. Race differentiation in *Fusarium oxysporum* f.sp. dianthi (Prill. et Dei.) Snyd. et Hansen. Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent. 40: 531-537
- Gardier, D. C., R.K. Horst and P.E. Nelson 1989. Influence of night temperature on disease development in Fusarium wilt of chrysanthemum. Plant Disease, 73:34-37
- Griffiths J., J. Miller., J. Suzuki., T. David., C. Lewontin and W. Gelbart (2000). An Introduction to Genetic Analysis. University of British Columbia USA. Séptima edición. 5: 148.
- Hernandez, R.G. Arbelaez, H. Junca, M. Posada y P. Del portillo. 1998. Identificación de marcadores genéticos del agente causal del marchitamiento del clavel *Fusarium oxysporum* f.sp. dianthi mediante aplicación arbitraria de fragmentos polimórficos de ADN. Revista Colombiana de Biotecnología 1: 51-57.
- Ite, T.J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications. Academic Press, New York, pp 315-322.
- Jones, I.B., I.P. Jones, R.E. Stall y T.A. Zitter 1997. Compendium of tomato diseases. The American Phytopathological Society Press. St. Paul.
- Konstadinos A., S.V. Barla and D. M. George (2015) Life cycle assessment of carnation production in Greece. *Grecia Journal of Cleaner Production* 112: 32-38
<https://www.infona.pl/resource/bwmeta1.element.elsevier-51826d57-fbf9-3e02-a91e-7e9d9283e912>
- Kistler, H.C. 1997. Genetic diversity in the plant-pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 87: 474-479.
- Martínez F. E. (2008) Hongos patógenos del cultivo del clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) en el estado de Morelos, México. Morelos México. Investigación Agropecuaria. 5(1):1-8

- Naeini, A.; Ziglari, T.; Shokri, H., y Khosravi, A. R. 2010. Assessment of growth-inhibiting effect of some plant essential oils on different *Fusarium* isolates. *Journal de Mycologie Médicale/ Journal of Medical Mycology*, 20(3), 174–178.
- Nelson, P. E., T. A. Toussoun and W. F. O. Marasas. 1983. *Fusarium* species: An illustrated manual for identification. Pennsylvania State University Press, University Park, PA, USA. 226 p.
- Nuñez C.R.D. 1978. Estudio sobre el control biológico de *Fusarium roseum* (Lk) Snyder y Hasen, cusante principal de la “Dormilona” del clavel en Villa Guerrero, Mex. Tesis de Maestria. Colegio de Postgraduados, Chapingo, Méx.
- 1981. Life cycle and epidemiology of *Fusarium oxysporum*. 51-80. In M. E.Mace, A: A: Bell and C. C. H. Beckman. (Eds.). *Fungal wilt diseases of plants*. Academic Press. New York.
- NCBI (National Center for Biotechnology Information). 2015. Nucleotide. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (accessed mar. 2018).
- Puhalla, J. E. 1989. Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. *Can. J. Bot.* 63: 179- 183.
- O’Donnell, K., Kistler, H.C., Cigelnik, E., and Ploetz, R.C. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:2044–2049.
- R the R Foundation for Statistical Computing. 2017. Version 3.4.3 Platform:x86_64-w64-ming32/x64.
- Rodriguez S.P.I y H.A.S. Barrera 2004. La reaccion en cadena de la polimerasa a dos decadas de su invención. *Ciencia UANL*. 7:3

SAS Institute Inc. 2002. SAS/STAT User's Guide, Version 9.4 SAS Institute Inc., Cary NC.

SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera) (2013) https://www.gob.mx/siap/es/archivo/acciones_y_programas consultado el 5 diciembre 2017

(2016) https://www.gob.mx/siap/es/archivo/acciones_y_programas_consultado_el_marzo_2017

Soto S.J.C., F.E.P. Barreto y J.J. Duarte (2009) relación entre el color de la flor del clavel (*Dianthus caryophyllus*) y la tolerancia a patógenos del género *Fusarium*. *Revista facultad de ciencias básicas*. 5(1): 116-129
<file:///C:/Users/Jorge/Downloads/2125-5704-1-SM.pdf>

Solís, R., L. Y. y A. Andrade T. 2005. ¿Qué son los marcadores moleculares? *Revista de Divulgación Científica y Tecnológica de la Universidad Veracruzana* Vol. XVIII. En línea <http://www.uv:/cienciahombre/revista/vol18num1/articulosmoleculares/index.htm> (consultado el 1 de noviembre 2016).

Snyder, W.e. y H.N. Hansen. 1940 The species concept in *Fusarium*. *American Journal of Botany* 27: 64-67.

Tramier, R., C. Antonini and A. Bettachini. Biological control of *Fusarium wilt* in camellias with different *Fusarium oxysporum* strains. *EPPO Bulletin* 18: 13-18.1988.

UPOV (Union Internacional para la Protección de las Obtenciones de Variedades) (2016) base de datos sobre variedades vegetales PLUTO <http://www.upov.int/pluto/es/> consultado el 3 enero 2017

Valadez M, E. y G. Kahl. 2000. Huellas de ADN en genomas de plantas. (Teoría y protocolo de laboratorios) editorial Mundi-Prensa México DF144 pág.

Mark A. Valasek. M.A Y J.J. Repa. 2005 The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education*. <https://doi.org/10.1152/advan.00019.2005>

Yagi M., T. Yamamoto., S. Isobe., H. Hirakawa., S. Tabata., K. Tanase., H. Yamaguchi and T. Onozaki., (2013) Construction of a reference genetic linkage map for carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Bio Med Central Genomics* 14:7 [http/doi:10.1186/1471-2164-14-734](http://doi:10.1186/1471-2164-14-734)