



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Instituto de Ecología

Variación interpoblacional en la  
incidencia de hongos patógenos de  
*Datura stramonium* L. (Solanaceae)

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA AMBIENTAL)**

P R E S E N T A

MEDINA ROMERO YOLI MARIANA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:  
DRA. MARÍA GRACIELA GARCÍA GUZMÁN

COMITÉ TUTOR:  
DRA. CONCEPCIÓN TORIELLO NÁJERA  
DR. JUAN NÚÑEZ FARFÁN

MÉXICO, D.F.

AGOSTO, 2012



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.





UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Instituto de Ecología

Variación interpoblacional en la  
incidencia de hongos patógenos de  
*Datura stramonium* L. (Solanaceae)

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA AMBIENTAL)**

P R E S E N T A

MEDINA ROMERO YOLI MARIANA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:  
DRA. MARÍA GRACIELA GARCÍA GUZMÁN

COMITÉ TUTOR:  
DRA. CONCEPCIÓN TORIELLO NÁJERA  
DR. JUAN NÚÑEZ FARFÁN

MÉXICO, D.F.

AGOSTO, 2012



Dr. Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 07 de mayo de 2012, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA AMBIENTAL)** de la alumna **MEDINA ROMERO YOLI MARIANA** con número de cuenta **301112745** con la tesis titulada "**Variación interpoblacional en la incidencia de hongos patógenos de *Datura stramonium* L. (Solanaceae)**", realizada bajo la dirección de la **DRA. MARIA GRACIELA GARCÍA GUZMÁN**:

Presidente: DRA. ANA LUISA ANAYA LANG  
Vocal: DR. FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA  
Secretario: DR. JUAN NÚÑEZ FARFÁN  
Suplente: DRA. MARTHA LYDIA MACÍAS RUBALCAVA  
Suplente: DRA. CONCEPCIÓN TORIELLO NÁJERA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 24 de julio de 2012.

*María del Coro Arizmendi*

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA  
COORDINADORA DEL PROGRAMA

c.c.p. Expediente de la interesada.

## **Agradecimientos institucionales**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de México (UNAM).

Al programa de becas del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico recibido con número de CVU/Becario: 345794/239871.

La presente tesis fue financiada por el proyecto CONACYT-81490, otorgado al Dr. Juan Núñez Farfán.

A mi Tutora la Dra. María Graciela García Guzmán por todo su apoyo, dirección, interés asesoría y valiosos comentarios que me permitieron la elaboración de la presente tesis.

A los miembros de mi Comité Tutor: Dra. Concepción Toriello Nájera y Dr. Juan Núñez Farfán por toda la asesoría, observaciones y comentarios durante los tutorales y fuera de ellos, que contribuyeron a mejorar la presente tesis.

## **Agradecimientos a título personal**

A mis padres Juan José Medina y María Luisa Romero, gracias por la vida, el amor, la paciencia, el apoyo, todo lo que me han enseñado, por creer en mí y aguantarme siempre. También quiero agradecerles por su acertada combinación de genes (mis hermanos). A mis hermanos Cuauhtli y Erandi, por su amor, apoyo y todo lo que me han enseñado. A Cuauhtli por ser un gran ejemplo para mí, porque estoy orgullosa de ti y porque gracias a ti y a Eli existe una gran felicidad en nuestras vidas: Balam. A Erandi porque también te admiro mucho y quisiera parecerme aunque sea un poco a ti, por consentirme tanto y por todas nuestras divertidas conversaciones. A mi ahijado Balam porque existes y haces que mi vida sea más feliz. Soy muy afortunada de tenerlos en mi vida y éstas palabras no bastan para demostrarles lo agradecida que estoy y cuánto los amo.

De nuevo a la Dra. María Graciela García Guzmán por haberme aceptado como su alumna de Maestría, por apoyarme, por toda la paciencia, por todas sus enseñanzas, por asesorarme durante los tutorales y después de ellos, y por dirigir mi tesis. Le agradezco también por contribuir a mi educación y formación como Maestra en Ciencias y que yo lograra concluir esta etapa. Gracias también por ser una excelente persona y por el buen humor que le caracteriza siempre. Es la mejor tutora que he tenido y el mejor ejemplo de lo que es ser una investigadora.

A la Dra. Conchita Toriello por haber aceptado ser parte de mi Comité Tutorial y posteriormente Miembro del Jurado, por sus asesorías y comentarios durante y después de los tutorales, por las enseñanzas sobre técnicas que no había realizado antes y por permitirme trabajar en su laboratorio. Le agradezco también por haber revisado mi tesis, ya que con sus valiosos comentarios y acertadas observaciones ésta quedo mucho mejor que la versión original.

Al Dr. Juan Núñez Farfán por haber formado parte de mi Comité Tutorial y ser Miembro del Jurado, por las asesorías, comentarios y observaciones durante y después de los tutorales, que mejoraron en gran medida la presente tesis. Gracias también por el buen humor con el que siempre me recibía en su laboratorio cuando iba a pedirle ayuda y asesoría durante la elaboración de este trabajo.

A la Dra. Ana Luisa Anaya por aceptar ser Miembro de mi Jurado y por haber revisado mi tesis, ya que sus observaciones y comentarios contribuyeron enormemente a la mejoría de la misma. Gracias por su valioso tiempo.

Al Dr. Javier Plasencia de la Parra por aceptar ser Miembro de mi Jurado, por haberme permitido trabajar en su laboratorio, asesorarme, por la paciencia y por facilitarme el material empleado en las técnicas moleculares que aprendí. También quiero agradecerle por revisar mi tesis con acertadas observaciones y comentarios, las cuales mejoraron mucho la versión final de mi tesis. Gracias por todo el apreciable tiempo que invirtió en mi tesis y en mi educación.

A la Dra. Martha Macías por haber aceptado ser Miembro de mi Jurado, por la asesoría, por revisar mi tesis y por los valiosos comentarios y observaciones que sirvieron para enriquecer esta tesis. Gracias por todo su apreciado tiempo.

A la Bióloga Irma Acosta Calixto por todo el apoyo que siempre me ha brindado y por los conocimientos que han ayudado considerablemente a mi educación y formación como Maestra en Ciencias. Gracias también por su amistad, su paciencia, por creer en mí y por ser un ejemplo de fortaleza y lucha ante las adversidades.

A la Dra. Irma Trejo Vázquez por su ayuda para la ubicación y caracterización climática de las poblaciones de estudio.

A la M. en C. Hortensia Navarro por todo su apoyo, paciencia, tiempo y asesoría sobre las técnicas de cultivos monospóricos.

A la Dra. Carmina Montiel por todos los conocimientos proporcionados sobre técnicas moleculares, por su apoyo, tiempo y paciencia.

A los profesores que tuve durante la Maestría por todas sus enseñanzas: Mark Olson, Leonardo Alvarado, Ricardo Reyes Chilpa, Teresa Valverde, Jaime Zúñiga. A mis profesores de la Licenciatura que contribuyeron a mi amor por la Biología: Alicia Callejas, Olga Villamar, Raúl Contreras, Javier Carmona, Víctor Valenzuela, Margarita Villegas, Adolfo Andrade.

A mi abuelita Felicitas por su apoyo, amor y sus ricas comidas. A mis padrinos Alma y Marcelo por su apoyo, cariño e interés en mi. A mi cuñada-comadre Elizabeth gracias por todo el apoyo, por mi ahijado Balam y por los buenos momentos compartidos. A mis tíos: Tita, Gustavo, María Elena, Meche, Juan, Francisco, Isela, Minerva, Pepe, Margarita, Edith, Felipe, Toña, Lupe y Rocío por su cariño y apoyo. A mis primos queridos y favoritos: Rodrigo, Lalo, Daniel, Gerardito, Cynthia, Marcelo, Alma, Edith, Abril, Marijo, Juan Carlos, Ale, Tony, Roxana, Edgar, Lucía, Belem, Angélica y Martín por su cariño y todas las alegrías que hemos compartido. A mis sobrinos: Nelsy, Erin, Mía, Renata, Farith y Nuria por la alegría de verlos. A la memoria de mis otros abuelitos, tíos, primos y sobrinos que ya no están aquí pero que igualmente siempre los querré y que espero que se sientan orgullosos de mi y de lo que he logrado.

A mis mejores amigos: Rosario por tu amistad y por los pocos pero muy buenos momentos que hemos compartido juntas, Irma Acosta por las pláticas tan interesantes a la hora de la comida y por el apoyo, Ángel por tu amistad, tu apoyo, por acompañarme a veces a comer y por las divertidas pláticas nocturnas, Jorge Arturo por tu amistad, por las pláticas tan divertidas y las actualizaciones sobre la vida de los demás conocidos, Toño mi "compañero de laboratorio" por acompañarme a comer, por las pláticas y momentos tan divertidos que he vivido a tu lado y a Nelly por su entusiasmo y apoyo siempre. A otros grandes amigos: Héctor Palacios por tu amistad y apoyo aunque sea a distancia, Luis mi amigo "perdido" y recuperado, Mirsha, Alfredo, Tania, Miguel, Gaby mi amiga desde la primaria, Marco, Alberto, Jorge Cruz muchas gracias por la asesoría sobre técnicas moleculares y por no hacerme sentir mal cuando te hacía preguntas tontas y a Memo por llevarme a las salidas de campo.

## Indice

<b>Resumen</b> .....	<b>i</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>ii</b>
<b>1. Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>2</b>
2.1. Objetivo general .....	2
2.2. Objetivos particulares.....	2
<b>3. Hipótesis</b> .....	<b>3</b>
<b>4. Antecedentes</b> .....	<b>3</b>
4.1. Las enfermedades fúngicas en las plantas .....	3
4.2. Influencia de los factores bióticos y abióticos en la incidencia de enfermedades fúngicas en sistemas naturales .....	4
4.3. Importancia de las enfermedades fúngicas en las plantas.....	8
4.4. Efectos de las enfermedades fúngicas en poblaciones y comunidades de plantas .....	9
4.5. Consecuencias evolutivas de la interacción planta-patógeno .....	11
<b>5. Sistema biológico</b> .....	<b>13</b>
<b>6. Métodos</b> .....	<b>14</b>
6.1. Área de estudio .....	14
6.2. Análisis de los niveles de daño causado por hongos patógenos a <i>D. stramonium</i> .....	15
6.3. Medición de los factores ambientales de cada sitio .....	16
6.4. Aislamiento de los hongos patógenos que atacan a <i>D. stramonium</i> .....	16
6.4.1. Obtención de cultivos monospóricos .....	17
6.4.2. Extracción de ADN.....	17
6.4.3. Amplificación por PCR del ADN genómico.....	18
6.4.4. Purificación y secuenciación del fragmento de ADN producido en la PCR..	19
6.5. Pruebas de patogenicidad en plantas de <i>D. stramonium</i> .....	20
6.5.1. Infección de las plantas de <i>D. stramonium</i> .....	21
6.5.2. Efecto del hongo en el desempeño y en el éxito reproductivo en plantas de <i>D. stramonium</i> .....	21
6.6. Análisis estadístico .....	22
<b>7. Resultados</b> .....	<b>23</b>
7.1. Niveles de daño foliar causado por hongos patógenos a <i>D. stramonium</i> .....	23
7.2. Relación de los factores ambientales con los niveles de daño foliar de <i>D. stramonium</i> .....	24

7.3. Identificación de los hongos patógenos que atacan a <i>D. stramonium</i> .....	32
7.4. Pruebas de patogenicidad y efecto de los hongos patógenos en el desempeño y en el éxito reproductivo en plantas de <i>D. stramonium</i> .....	34
<b>8. Discusión .....</b>	<b>42</b>
8.1. Niveles de daño foliar causado por hongos patógenos a <i>D. stramonium</i> .....	42
8.2. Relación de los factores ambientales con los niveles de daño foliar de <i>D. stramonium</i> .....	43
8.3. Identificación de los hongos patógenos que atacan a <i>D. stramonium</i> .....	44
8.4. Efectos de <i>Alternaria</i> sp. en el desempeño y en el éxito reproductivo en plantas de <i>D. stramonium</i> .....	45
<b>9. Conclusiones .....</b>	<b>48</b>
<b>10. Literatura citada.....</b>	<b>48</b>
<b>11. Anexo .....</b>	<b>54</b>

## Lista de figuras y tablas

<b>Fig. 1.</b> <i>Datura stramonium</i> L.	<b>14</b>
<b>Fig. 2.</b> Localización de las poblaciones de estudio en los estados de Guerrero, Hidalgo, Tlaxcala y Puebla.	<b>15</b>
<b>Fig. 3.</b> Porcentaje de hojas dañadas por hongos por planta en 10 poblaciones de <i>Datura stramonium</i> localizadas en el centro de México.	<b>23</b>
<b>Fig. 4.</b> Porcentaje de área foliar dañada por hongos por planta en 10 poblaciones de <i>Datura stramonium</i> localizadas en el centro de México.	<b>24</b>
<b>Fig. 5.</b> Relación entre el porcentaje de hojas dañadas por hongos y el porcentaje de hojas dañadas por herbivoría en poblaciones de <i>Datura stramonium</i> localizadas en el centro de México.	<b>25</b>
<b>Fig. 6.</b> Relación entre el porcentaje de área foliar dañada por hongos y la precipitación media anual en poblaciones de <i>Datura stramonium</i> localizadas en el centro de México.	<b>26</b>
<b>Fig. 7.</b> Relación entre el porcentaje de hojas dañadas por hongos y la altura en poblaciones de <i>Datura stramonium</i> localizadas en el centro de México.	<b>27</b>
<b>Fig. 8.</b> Relación entre el porcentaje de hojas dañadas por hongos y el número de frutos en poblaciones de <i>Datura stramonium</i> localizadas en el centro de México.	<b>27</b>
<b>Fig. 9.</b> Relación entre el porcentaje de hojas dañadas por hongos y el porcentaje de hojas dañadas por herbivoría en poblaciones de <i>Datura stramonium</i> localizadas en el centro de México.	<b>28</b>
<b>Fig. 10.</b> Relación entre el porcentaje de hojas dañadas por hongos y el porcentaje de área foliar dañada por hongos en poblaciones de <i>Datura stramonium</i> localizadas en el centro de México.	<b>29</b>
<b>Fig. 11.</b> Relación entre el porcentaje de área foliar dañada por hongos y la altura en poblaciones de <i>Datura stramonium</i> localizadas en el centro de México.	<b>30</b>
<b>Fig. 12.</b> Relación entre el porcentaje de área foliar dañada por hongos y el porcentaje de hojas dañadas por herbivoría en poblaciones de <i>Datura stramonium</i> localizadas en el centro de México.	<b>30</b>
<b>Fig. 13.</b> Relación entre el porcentaje de área foliar dañada por hongos y el porcentaje de hojas dañadas por herbivoría en poblaciones de <i>Datura stramonium</i> localizadas en el centro de México.	<b>31</b>
<b>Fig. 14.</b> Secuencias obtenidas del fragmento de ADN producido en la PCR.	<b>57</b>
<b>Fig. 15.</b> Resultados de la alineación con el programa BLAST de la secuencia ITS2.	<b>57</b>
<b>Fig. 16.</b> Descripción de los tres géneros de hongos aislados de las poblaciones de <i>Datura stramonium</i> .	<b>33</b>
<b>Fig. 17.</b> Plantas inoculadas con <i>Alternaria</i> sp. en invernadero. Tratamientos con 0 %, 25 %, 50 %, 75 % y 100 % de hojas inoculadas. Síntoma desarrollado por las plantas.	<b>58</b>
<b>Fig. 18.</b> Valores promedio por planta por tratamiento del número de hojas producidas, flores, frutos, altura, diámetro y área foliar dañada.	<b>59</b>
<b>Fig. 19.</b> Número de semillas producidas en promedio por fruto por planta en cada uno de los tratamientos.	<b>35</b>
<b>Fig. 20.</b> Relación entre el número de hojas producidas y número de semillas producidas por fruto.	<b>37</b>
<b>Fig. 21.</b> Relación entre el número de semillas producidas por fruto y el diámetro.	<b>37</b>
<b>Fig. 22.</b> Relación entre la altura y el diámetro.	<b>38</b>
<b>Fig. 23.</b> Relación entre el número de frutos y el número de semillas producidas por fruto.	<b>39</b>
<b>Fig. 24.</b> Relación entre el número de hojas producidas y el número de flores.	<b>39</b>
<b>Fig. 25.</b> Relación entre el número de hojas producidas y el número de frutos.	<b>40</b>
<b>Fig. 26.</b> Relación entre el número de flores y el número de frutos.	<b>40</b>
<b>Fig. 27.</b> Relación entre el porcentaje de área foliar dañada y el número de hojas producidas.	<b>41</b>
<b>Fig. 28.</b> Relación entre el porcentaje de área foliar dañada y el número de semillas producidas por fruto.	<b>41</b>
<b>Tabla 1.</b> Ubicación geográfica, altitud, precipitación media anual, temperatura media anual, tipos de vegetación y clima presente en las poblaciones de estudio.	<b>54</b>
<b>Tabla 2.</b> Valores promedio por población de los factores ambientales: temperatura media anual, precipitación media anual, porcentaje de hojas dañadas por herbivoría, porcentaje de área foliar dañada por herbivoría, número de frutos y altura.	<b>55</b>
<b>Tabla 3.</b> Valores de las $X^2$ obtenidas de la prueba de Wilcoxon/Kruskal-Wallis aplicadas para cada factor.	<b>56</b>
<b>Tabla 4.</b> Correlaciones por sitio entre los factores bióticos y abióticos con los niveles de daño foliar causado por hongos.	<b>56</b>
<b>Tabla 5.</b> Correlaciones por individuo por sitio entre los factores bióticos con los niveles de daño foliar.	<b>56</b>
<b>Tabla 6.</b> Correlaciones del tratamiento con el 0% de hojas inoculadas con la suspensión de micelio-esporas entre los caracteres medidos.	<b>60</b>
<b>Tabla 7.</b> Correlaciones del tratamiento con el 25% de hojas inoculadas con la suspensión de micelio-esporas entre los caracteres medidos.	<b>60</b>
<b>Tabla 8.</b> Correlaciones del tratamiento con el 50% de hojas inoculadas con la suspensión de micelio-esporas entre los caracteres medidos.	<b>61</b>
<b>Tabla 9.</b> Correlaciones del tratamiento con el 75% de hojas inoculadas con la suspensión de micelio-esporas entre los caracteres medidos.	<b>61</b>
<b>Tabla 10.</b> Correlaciones del tratamiento con el 100% de hojas inoculadas con la suspensión de micelio-esporas entre los caracteres medidos.	<b>62</b>

## Resumen

Los efectos de los microorganismos patógenos en sus plantas hospederas varían desde la reducción en el crecimiento y el éxito reproductivo, hasta la muerte. También pueden influir en la competencia, la distribución y la estructura genética de las poblaciones, la diversidad de las comunidades, en la evolución del sexo y en facilitar las invasiones bióticas. En este trabajo se determinó si existía variación interpoblacional en los niveles de daño foliar causado por hongos patógenos en poblaciones de *Datura stramonium*. Se seleccionaron 10 poblaciones localizadas en los estados de Hidalgo, Puebla, Tlaxcala y Guerrero. Con la ubicación de las poblaciones se obtuvieron los valores promedio anuales de la temperatura y la precipitación. En cada población se seleccionaron al azar 40 individuos, a los que se les midió su altura, el número de hojas y de frutos. Se analizó cada una de las hojas para determinar si presentaban daño por hongos patógenos y/o daño por insectos herbívoros. Aquellas hojas con evidencia de ataque por hongos, se colectaron para evaluar el área foliar dañada por individuo y para identificar a los agentes causales del daño. También se colectaron semillas para obtener plantas, que posteriormente se emplearon para llevar a cabo pruebas de patogenicidad. En promedio, el porcentaje de hojas dañadas por planta por población fue de  $1.26 \% \pm 1.35$  EE. En promedio, el porcentaje de área foliar dañada por planta por población fue de  $3.54 \% \pm 2.98$  EE. La correlación entre la precipitación media anual y el porcentaje de área foliar dañada por hongos nos indica que a mayor precipitación las hojas tuvieron más daño. En las correlaciones entre el porcentaje de hojas dañadas por hongos con la altura de la planta y con el número de frutos se encontró que en plantas con poca altura y pocos frutos hay un mayor número de hojas dañadas. En el caso del número de hojas dañadas por hongos y su correlación con el área foliar dañada por éstos, se observó que en las plantas que tuvieron más hojas dañadas, hubo más daño en las hojas también. Finalmente, las correlaciones entre el área foliar dañada por hongos con la altura de la planta y con el porcentaje de hojas dañadas por herbivoría, nos indican que en las plantas de mayor altura y que son más atacadas por insectos herbívoros hubo también un mayor daño en las hojas causado por hongos. En general, estos resultados concuerdan con observaciones realizadas en otros sistemas naturales. Se identificaron tres especies de hongos: *Alternaria* sp., *Epicoccum* sp. y *Phoma* sp. En este estudio encontramos variaciones en la incidencia de hongos patógenos entre las poblaciones de *D. stramonium*. Estas variaciones se pueden deber tanto a características morfológicas de las plantas como a factores ambientales asociados a las poblaciones. La diversidad de hongos que atacan a *D. stramonium* en las poblaciones estudiadas no es muy grande por lo que esta planta se considera un buen sistema para estudios posteriores de coevolución.

## Abstract

The effects of pathogenic microorganisms on their host plants vary from reductions in growth and reproductive success to death. Pathogens can also affect the outcome of competition, distribution and genetic structure of populations, diversity of communities, influence the evolution of sex and facilitate biotic invasions. In this work we determined the levels of leaf damage caused by fungal pathogens in populations of *Datura stramonium*. We selected 10 populations located in the states of Hidalgo, Puebla, Tlaxcala and Guerrero (Mexico). With the location of the populations we obtained annual average values of temperature and precipitation. In each population 40 individual plants were randomly selected. For each plant, the number of leaves, fruits, and plant height were measured. Each leaf was analyzed to determine damage caused by fungal pathogens and/or herbivorous insect. Leaves showing evidence of fungal attack were collected to assess leaf area damaged per plant, and to isolate and identify the agents of damage. Also, seeds were collected to grow plants that were later used to carry out pathogenicity tests. On average, the percentage of damaged leaves per plant per population was  $1.26 \% \pm 1.35 \text{ EE}$ . On average, the percentage of damaged leaf area per plant per population was  $3.54 \% \pm 1.89 \text{ EE}$ . The correlation between mean annual precipitation and the percentage of leaf area damaged by fungi indicates that in sites with higher precipitation the leaves had more damage. The correlations between the percentage of leaves damaged by fungi with height and with fruit number showed that in plants with few fruits and low rise presented a higher leaves damaged. In the percentage of fungal leaves damage and their correlation with the percentage of fungal leaf area damage plants that had more leaves damaged had also more damage on each leaf. Finally, the correlations between fungal leaf area damage with height and the percentage of leaves damaged by herbivores indicated that taller plants with more insect herbivores attack presented greater leaf damage by fungi. Overall, these results are consistent with observations made in other natural systems. We identified three species of fungi: *Alternaria* sp., *Epicoccum* sp. and *Phoma* sp. In this study we found variations in the incidence of fungal pathogens among populations of *D. stramonium*. These variations could be due to plant morphological characteristics and environmental factors associated with populations. Because the diversity of fungi that attack *D. stramonium* among the studied populations is not very large, this could be a good system for further studies of coevolution.

## 1. Introducción

Los microorganismos fitopatógenos son un tipo de parásitos que causan enfermedades a las plantas al afectar el metabolismo de las células por diversos mecanismos, entre otros, por medio de enzimas, toxinas y reguladores del crecimiento (Agrios, 1997). Las plantas reaccionan a la enfermedad, produciendo estructuras y sustancias químicas que interfieren con el avance o la existencia del patógeno. Por lo tanto, para que un patógeno infecte a una planta, debe ser capaz de entrar, obtener los nutrientes y neutralizar las reacciones de defensa de la planta (Lindquist, 1975; Agrios, 1997; Lenné, 2002).

Los hongos juegan un papel importante en las poblaciones y en las comunidades naturales de plantas, ya que pueden afectar la competencia intra- e inter- específica, influir en la distribución y en la estructura genética de las poblaciones, en la diversidad de las comunidades y en la evolución del sexo (Burdon, 1987). Varios estudios han mostrado que la incidencia de enfermedades varía entre poblaciones naturales de plantas (Burdon, 1987, 1993; Jarosz y Davelos, 1995; García-Guzmán *et al.*, 1996; Gilbert, 2002) y que los patógenos pueden afectar el éxito reproductivo de sus plantas hospederas (Burdon, 1987, 1993; Boyette y Turfitt, 1988; Jarosz y Davelos, 1995; Gilbert, 2002).

Los consumidores herbívoros, patógenos y parásitos son los responsables también de la evolución de los mecanismos de defensa en las plantas (Espinosa-García, 2001). Uno de los mecanismos de protección presente en las plantas es la defensa química mediante la producción de metabolitos secundarios (Espinosa-García, 2001). Otro es la defensa física por medio de características estructurales, como tricomas o espinas, los cuales actúan como barreras físicas (Agrios, 1997). Además, la presión constante por parte de los consumidores afecta la adecuación de las plantas, por lo tanto, se ha sugerido que la variación individual en los mecanismos de defensa favorece la evolución de características que disminuyen o atenúan el daño (Núñez-Farfán y Dirzo, 1994; Espinosa-García, 2001; Valverde *et al.*, 2001; 2003; Fornoni *et al.*, 2004). Por otra parte, en la teoría del "Mosaico Geográfico de la Coevolución" se sugiere que el éxito reproductivo de una especie depende de la distribución de los genotipos en otra especie, además, la interacción se encuentra dentro de un mosaico geográfico por lo que habrá variaciones en los genotipos, la interacción y el ambiente,

mediante las cuáles actuará la selección diferencialmente. Un sistema que permitiría mostrar cómo la heterogeneidad ambiental afecta las respuestas y resultados de las interacciones, es el que incluye las interacciones planta-patógeno (Thompson, 2005).

Algunos estudios han demostrado que la hierba anual *Datura stramonium* (Solanaceae), es susceptible al ataque por hongos y sirve como hospedero alternativo de muchos de ellos, funcionando así como fuente de infección para cultivos (Weaver y Warwick, 1984; Núñez Farfán, 1991). Uno de los hongos que la ataca, *Alternaria crassa*, ha sido utilizado exitosamente como control biológico contra *D. stramonium* (Boyette, 1986; Boyette y Turfitt, 1988; Boyette *et al.*, 1991; Hoagland y Boyette, 1994). Sin embargo, estos estudios no se han enfocado en la interacción planta-patógeno. Aunque se cuenta con mucha información sobre el papel de otro tipo de consumidores, como los herbívoros en la dinámica poblacional de *D. stramonium*, es importante conocer el efecto de los hongos patógenos en esta especie. Por lo tanto el presente estudio se centrará en identificar a los hongos patógenos que afectan el follaje de *D. stramonium* en varias poblaciones localizadas en el centro de México, analizar su incidencia en las poblaciones y determinar si existe variación interpoblacional. Finalmente, se investigará si la incidencia de enfermedades en las diferentes poblaciones es afectada por factores ambientales.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo general**

Determinar y cuantificar el daño foliar causado por hongos patógenos en varias poblaciones de *D. stramonium* localizadas en el centro de México.

### **2.2. Objetivos particulares**

Analizar los niveles de daño foliar causados por hongos patógenos en las poblaciones.

Identificar los hongos patógenos que atacan el follaje de *D. stramonium* y determinar si existen diferentes especies de hongos patógenos que atacan a las poblaciones de esta planta.

Investigar el efecto de la temperatura y la precipitación media anual en la incidencia de enfermedades en *D. stramonium*.

### **3. Hipótesis**

Las variaciones en las diferentes especies de hongos patógenos que atacan a *D. stramonium* y en los niveles de daño foliar en las poblaciones se ven influenciadas por los factores ambientales (temperatura y precipitación media anual) característicos de cada sitio.

### **4. Antecedentes**

#### **4.1. Las enfermedades fúngicas en las plantas**

Los microorganismos fitopatógenos son aquellos que, frente a una planta susceptible y en condiciones ambientales adecuadas, producen una enfermedad (Lindquist, 1975). Una enfermedad se define como la alteración de una o más funciones fisiológicas esenciales de las plantas como resultado de una relación dinámica y perjudicial con los microorganismos que las parasitan (Burdon, 1987; Agrios, 1997; Lenné, 2002; Windham y Windham, 2008). Los microorganismos tienen la capacidad de interferir con las funciones celulares normales de las plantas al producir, entre otros, toxinas que rompen o destruyen células, reguladores del crecimiento o enzimas que interfieren con las funciones celulares normales, o pueden absorber agua o nutrientes necesarios para las funciones celulares del hospedero (Pirofski y Casadevall, 2008; Windham y Windham, 2008). Los patógenos también pueden iniciar la enfermedad bloqueando el sistema vascular de las plantas, por lo que el agua y los nutrientes no pueden moverse normalmente dentro de ella (Windham y Windham, 2008).

Las enfermedades fúngicas pueden tener diferentes efectos en la planta como el deterioro parcial o la muerte (Lindquist, 1975; Agrios, 1997). Sin embargo, el efecto de las enfermedades fúngicas en las plantas depende de las condiciones fisiológicas del hospedero y del nivel del daño causado por el patógeno (Waller y Lenné, 2002). Al principio, la afección se puede localizar en una o pocas células y es indetectable

(Lindquist, 1975). Posteriormente, la reacción se extiende, y afecta partes de la planta que desarrollan cambios visibles (Lindquist, 1975; Agrios, 1997). Todo esto se conjunta en un proceso conocido como el ciclo de la enfermedad que se refiere a una serie de eventos que permiten el desarrollo de la ésta y la perpetuación del patógeno. Dicho proceso, incluye cambios fisiológicos tanto en la planta como en el patógeno y la aparición de síntomas en las plantas (Agrios, 1997). Las etapas del ciclo de la enfermedad fúngica son: adhesión, penetración, infección, invasión, reproducción y diseminación (Agrios, 1997; Windham y Windham, 2008). La infección ocurre cuando la unidad de agentes patógenos infecciosos o propágulos se establece sobre o en la proximidad cercana a la pared de las células del hospedero (Agrios, 1997; Arnold *et al.*, 2003; Windham y Windham, 2008). Posteriormente, el propágulo penetra la pared celular. El propágulo que puede ser una espora, la cual germina y el tubo germinal penetra directa o indirectamente a través de heridas o aberturas naturales (Dimond, 1975; Agrios, 1997; Windham y Windham, 2008). Una vez que el patógeno penetra la pared celular, se puede desarrollar una relación alimenticia con el hospedero y es entonces cuando la célula se considera infectada (Agrios, 1997; Waller y Cannon, 2002; Windham y Windham, 2008). Después de que la infección tiene lugar, el patógeno puede crecer e invadir otras partes del hospedero y/o reproducirse (Agrios, 1997; Windham y Windham, 2008). Los nuevos propágulos pueden dispersarse o diseminarse por distintos medios como el aire, la lluvia, dentro o sobre vectores, semillas o sobre escombros o material contaminado (Dix y Webster, 1995; Carlile *et al.*, 2001; Windham y Windham, 2008).

#### **4.2. Influencia de los factores abióticos y bióticos en la incidencia de enfermedades fúngicas en sistemas naturales**

La aparición, expresión fenotípica, incidencia y severidad de las enfermedades fúngicas de las plantas son afectadas por factores climáticos, edáficos y bióticos (Burdon, 1987; 1993; Lenné *et al.*, 1994; Shaw y Peters, 1994, Scheffer, 1997). En particular, el clima determina la distribución de muchas enfermedades de plantas (Scheffer, 1997) e influye en el desarrollo de epidemias a través de sus efectos en varias fases en el desarrollo de la planta hospedera (Campbell y Madden, 1990) o mediante efectos en la hospedera antes de que ocurra la infección (predisposición) y en la asociación hospedera-patógeno una vez que la infección ha ocurrido (Burdon, 1987). Particularmente, las condiciones ambientales pueden afectar las interacciones entre los

patógenos y sus hospederas actuando directamente sobre los hongos en los periodos en los que no están íntimamente ligados a ellas, mediante cambios que pueden reducir la supervivencia o prevenir el establecimiento de nuevas relaciones parasíticas (Burdon, 1987; 1993; Scheffer, 1997); induciendo cambios sustanciales en la susceptibilidad relativa de una planta hospedera a la infección; o una vez que la relación parasítica se establece, las variaciones en las condiciones ambientales pueden cambiar la expresión de los síntomas de la enfermedad (Burdon, 1987; Scheffer, 1997). El ambiente también puede alterar la expresión fenotípica de la resistencia en la planta y de la virulencia o falta de ella en el patógeno (Burdon, 1987). Por lo tanto, los cambios en aspectos bióticos y abióticos del ambiente, solos o en conjunto, afectan el tamaño y variación fenotípica de la población de patógenos (Burdon, 1987; 1993; Shaw y Peters, 1994).

Por otra parte, los factores abióticos pueden restringir el efecto de los patógenos a localidades o estaciones en las cuales el ambiente es favorable para su crecimiento y desarrollo (Lenné *et al.*, 1994). Los factores abióticos más importantes que influyen en la distribución geográfica de los patógenos son la temperatura y la humedad (Burdon, 1987; Manners, 1993; Scheffer, 1997; Fujita *et al.*, 2006; Bowen, 2008). Frecuentemente, la humedad determina el desarrollo de los hongos y por lo tanto, también de las enfermedades que causan (Burdon, 1987; Campbell y Madden, 1990; Paul, 1990; Harrison *et al.*, 1994). Una etapa particular del ciclo de vida del patógeno puede requerir una condición específica de humedad antes de que pueda causar una enfermedad o que ésta continúe su desarrollo (Harrison *et al.*, 1994). Los principales efectos de la humedad se reflejan en la formación de esporas, la supervivencia, la germinación y la infección (Burdon, 1987; Harrison *et al.*, 1994; Gould, 2008). En general, la temperatura es el factor ambiental que más afecta la resistencia de las plantas a la enfermedad (Manners, 1993). Las variaciones en la intensidad lumínica también afectan el éxito de la germinación de esporas y el establecimiento de la enfermedad (Burdon, 1987). Otro factor ambiental que influye es el viento por ser el medio por el cual el inóculo se dispersa o se extiende en un área geográfica (Bowen, 2008). Por ejemplo, en un estudio realizado con la planta *Anemone nemorosa* y las royas *Tranzchelia anemones* y *Ochropsora ariae*, se encontró que la abundancia e incidencia de *T. anemones* en las poblaciones muestreadas parece estar relacionada con factores abióticos. El efecto de las dos royas sobre el rendimiento de las plantas, depende de las condiciones ambientales. Por ejemplo, en los sitios abiertos, los niveles

de enfermedad son significativamente mayores que en los sitios cerrados, esto se debió a que en los sitios cerrados las plantas enfermas tienen un periodo de vida más corto y se reduce su crecimiento junto con su habilidad competitiva. Además se observó que las dos royas ocasionalmente se encuentran juntas en la misma hoja y la frecuencia de *T. anemones* es mayor en poblaciones en donde se encuentra sola (García-Guzmán y Wennström, 2001).

La regulación de las poblaciones de patógenos puede darse directamente a través de las interacciones con las hospederas, por interacciones con otros organismos que viven dentro o alrededor de las hospederas, por competidores o mutualistas, o por depredación o parasitismo (Shaw y Peters, 1994; Fournier *et al.*, 2006). Las hospederas pueden regular las poblaciones de patógenos que las atacan a través de mecanismos de defensa. Por ejemplo, la planta *Zea mays* var. *delprim*, es parcialmente resistente al hongo *Setosphaeria turcica* debido a que libera cantidades grandes de compuestos volátiles inducidos por herbívoros por lo que la enfermedad no es tan severa (Rostás *et al.*, 2006). En otro estudio realizado con la planta *Lycopersicon esculentum*, se demostró que la defensa inducida por el compuesto químico Actigard® 50 GS [benzo (1,2,3)tiadizol-7-ácido carbotioico(S)-metil ester)] (BTH) proporcionó a la planta protección general contra el hongo *Fulvia fulva* y los insectos herbívoros *Liriomyza trifolii* y *Bemisia argentifolii* (Inbar *et al.*, 1998). Además, la infección por hongos puede hacer que la planta hospedera sea más atractiva para otros consumidores. Por ejemplo, cuando a la planta *Cucumis sativus* se le infecta con el hongo *Colletotrichum orbiculare*, la infección la hace más atractiva para los insectos herbívoros *Diabrotica undecimpunctata howardi* y *Aphis gossypii* y le confiere cierta resistencia a la infección por otros hongos como *Cladosporium cucumerinum* (Moran, 1998). Otro ejemplo en el que las plantas hospederas infectadas son preferidas por los herbívoros, se puede observar al infectar a la planta *Arachis hypogaea* con el hongo *Sclerotium rolfsii*, ya que las plantas infectadas son preferidas por el insecto herbívoro *Spodoptera exigua* (Cardoza *et al.*, 2002). Es común encontrar que una sola especie de planta hospedera esté infectada por varias especies de hongos (Burdon, 1987; Shaw y Peters, 1994). Por ejemplo, en un estudio, se utilizaron 53 especies de hongos necrótrofos aislados de diversas plantas, utilizando 45 especies de árboles de bosque tropical de Panamá para evaluar el rango de hospederos de estos hongos. Se encontró que la mayoría de los hongos tienen un número moderado de especies hospederas potenciales; sólo dos de las especies de hongos se restringieron a una sola especie de

hospedero y muy pocos hongos son ampliamente generalistas. Se concluyó que en el bosque tropical la mayoría de los hongos tienen un gran número de hospederos que se encuentran localmente disponibles, pero casi todas las especies de plantas locales son resistentes (Gilbert y Webb, 2007).

Los factores bióticos son capaces de regular o desestabilizar a las poblaciones patógenas, y sus efectos varían de acuerdo al tamaño de las poblaciones (Shaw y Peters, 1994). Dentro de los factores bióticos se encuentran el tamaño de los individuos y sus vecinos, diferencias en el grado de sombra de cada hoja, la nutrición mineral de las plantas y la edad ontogénica de las diferentes partes de la planta, así como la presencia o ausencia de otros organismos patógenos o no, que pueden en conjunto afectar la incidencia y expresión de la enfermedad (Burdon, 1987). Por ejemplo, se ha visto que la cantidad de hojarasca del árbol *Nectandra ambigens* afecta las interacciones bióticas, ya que puede favorecer la aparición de enfermedades fúngicas en el follaje de plántulas cuando se a éstas se les agregan hojas que pudieran estar infectadas por hongos. Este es el primer trabajo que revela a la hojarasca como una posible fuente de infección del follaje por hongos en un sistema tropical natural. Además, en este estudio se encontró una relación positiva entre el daño por patógenos y los niveles de herbivoría (García-Guzmán y Benítez-Malvido, 2003). Los insectos herbívoros pueden ser vectores específicos o no que propagan a los patógenos entre órganos dentro de una misma planta, de una planta a otra, o entre plantas de un sitio a otro. La transmisión de las esporas puede realizarse de tres formas: la primera ocurre cuando los insectos se alimentan o caminan sobre el área de la planta infectada que tiene en su superficie las esporas de hongos, las esporas se adhieren a los insectos y son transportadas a otras plantas o partes de la misma planta donde inicia una nueva infección; la segunda, sucede cuando los insectos se alimentan de tejidos infectados de la planta por lo que llevan al patógeno en su aparato bucal y lo depositan cuando se alimentan de otras plantas u otras partes de la planta; la tercera, es ingiriendo al patógeno junto con la savia de la que se alimentan, éste circula por el cuerpo del insecto y llega a las glándulas salivales y al aparato bucal del insecto a través del cual es inyectado en la siguiente planta en la que el insecto se alimente. Los insectos pueden facilitar la entrada de un patógeno a su hospedero debido a que rompen la epidermis y otros tejidos protectores de las plantas al alimentarse o depositar sus huevos (Agrios, 2008). Por ejemplo, en el trabajo realizado con los insectos herbívoros *Cassida rubiginosa*, *Uroleucon cirsii* y *Aphis fabae* ssp.

*Cirsiiacanthoidis*, así como con el hongo *Puccinia punctiformis* en la planta hospedera *Cirsium arvense*, se encontró que los insectos herbívoros son vectores del hongo al transportar las esporas en sus patas y en su cuerpo. También se observó que la interacción entre el patógeno con cada insecto herbívoro dentro de la planta fue diferente con cada especie: por ejemplo, con *C. rubiginosa* fue antagonista, con *U. cirsii* fue mutualista, mientras que no hubo ninguna interacción con *A. fabae* ssp. *cirsiiacanthoidis*. Además, el trabajo mostró que hubo competencia entre el hongo y los insectos herbívoros, ya que la presencia de éstos redujo la infección del hongo mediante inoculaciones manuales en las plantas. Finalmente, se encontró que la infección local tiende a retrasar el desarrollo y reducir el peso de los adultos del insecto *C. rubiginosa* (Kluth *et al.*, 2002).

#### **4.3. Importancia de las enfermedades fúngicas en las plantas**

Las enfermedades causadas por hongos son las que se encuentran más comúnmente en las plantas (Scheffer, 1997), pueden causar mortalidad y reducción de su éxito reproductivo (Burdon, 1987; Manners, 1993; Gilbert, 2002; Shaw, 2006; Alexander, 2010); reducir el crecimiento y el vigor general (Burdon, 1987; Alexander, 2010) afectar las relaciones competitivas (Burdon, 1987), alterar su metabolismo, ya que reducen el área foliar y estructuras asociadas con la actividad fotosintética (Gilbert, 2002; Robert *et al.*, 2004). Además hacen propensos a las hospederas afectados a sufrir un déficit de agua (Burdon, 1987; Manners, 1993). Sin embargo, el efecto de las enfermedades fúngicas está ligado a la etapa del ciclo de vida de la hospedera en la cual ocurre la enfermedad, por lo que la severidad y la reproducción de la hospedera no tienen una relación simple (Burdon, 1987).

Para conocer la importancia que tienen las enfermedades fúngicas en las plantas es necesario considerar los ciclos de vida de los organismos que están interactuando. Los hongos patógenos pueden ser biótrofos o necrótrofos. Los hongos biótrofos son aquellos organismos completamente dependientes de otro organismo vivo como una fuente de nutrientes. Mientras que los necrótrofos son hongos que matan los tejidos a medida que crecen a través de ellos, de tal manera que siempre colonizan sustrato muerto (Holliday, 1992). Los patógenos pueden atacar a la hospedera en diferentes etapas del ciclo de vida y tienen efectos diferentes en la longevidad y fecundidad de

las plantas hospederas (Burdon, 1987). Además, las plantas hospederas pueden ser susceptibles en algunas etapas del ciclo de vida y resistentes en otras (Manners, 1993). Se ha observado que en los tejidos mejor defendidos de la hospedera, los patógenos crecen más lentamente (Shaw y Peters, 1994). Por lo que la importancia que tiene cada patógeno varía en función de la etapa del ciclo de vida en el que es atacada la planta hospedera (Burdon, 1987).

En cada etapa del ciclo de vida de la planta hospedera también se pueden encontrar diferencias entre la susceptibilidad y la resistencia de cada uno de sus órganos (Manners, 1993). Estas diferencias junto con el tamaño, la estructura, la complejidad arquitectónica, el genotipo de la hospedera y del patógeno (Burdon, 1987; Campbell y Madden, 1990), la edad del tejido o de la planta hospedera (Bowen, 2008), el ambiente (Campbell y Madden, 1990), la capacidad de dispersión del patógeno dentro y entre parches de poblaciones de plantas, el número promedio de generaciones de patógenos y asociaciones de poblaciones de patógenos anteriores (Burdon, 1987; Bowen, 2008) contribuyen a que las plantas sean hospederas de un amplio rango de patógenos. Aunque el rango de patógenos es amplio, cada etapa del ciclo de vida de las plantas hospederas es afectado por un grupo limitado y similar de patógenos (Burdon, 1987).

#### **4.4. Efectos de las enfermedades fúngicas en poblaciones y comunidades de plantas**

Los hongos influyen en las poblaciones y en las comunidades naturales de plantas al reducir la supervivencia y reproducción de sus hospederos (Roy *et al.*, 2004), afectando el resultado de la competencia intra e inter-específica (Burdon, 1987; Gilbert, 2002), la distribución y la estructura genética de las poblaciones (Burdon, 1987; 1997; Gilbert, 2002; Fournier *et al.*, 2006), la diversidad de las comunidades (Burdon, 1997; Gilbert, 2002; Fournier *et al.*, 2006; Alexander, 2010) y en la evolución del sexo (Burdon, 1987). Las enfermedades fúngicas también pueden facilitar el proceso sucesional (Gilbert, 2002; Alexander, 2010) y tener efectos dependientes de la frecuencia en el daño por herbívoros (Gilbert, 2002; Fournier *et al.*, 2006). Por ejemplo, en un estudio se probaron los efectos que tenían el insecto herbívoro *Calacarus flagellisetia* y el hongo *Oidium caricae* en la planta *Carica papaya*. En este estudio se observó que el herbívoro tuvo un efecto negativo sobre el patógeno, es

decir, que en presencia del herbívoro, las poblaciones de patógenos fueron pocas y pequeñas. Sin embargo, el patógeno no tuvo efecto sobre las poblaciones de herbívoros. También se redujo el desempeño de la planta cuando fue atacada por cada consumidor tanto por separado como en conjunto (Fournier *et al.*, 2006). Varios estudios han mostrado que los patógenos pueden afectar el éxito reproductivo de sus plantas hospederas (Burdon, 1987; Boyette y Turfitt, 1988; Burdon, 1993; Jarosz y Davelos, 1995; Gilbert, 2002) y que la incidencia de enfermedades varía entre poblaciones de plantas (Burdon, 1987; 1993; Jarosz y Davelos, 1995; García-Guzmán *et al.*, 1996; Gilbert, 2002).

Las poblaciones naturales de plantas son genéticamente diversas y están conformadas por plantas de diferentes edades y etapas del desarrollo (Alexander, 2010), se distribuyen en forma agrupada (Burdon, 1987; 1997; Burdon *et al.*, 1990; Alexander, 2010) y se encuentran dentro de arreglos espaciales complejos con muchas otras especies (Alexander, 2010). Dentro de las especies que coexisten con las poblaciones de plantas se encuentran los patógenos. Los patógenos pueden contribuir a la regulación denso dependiente de las poblaciones naturales de plantas (Burdon, 1987; May, 1990; Gilbert, 2002) al reducir el tamaño poblacional y producir cambios en la distribución espacial (Gilbert, 2002; Alexander, 2010) con lo que se modifica la distancia entre hospederos susceptibles y la probabilidad de transmisión de los propágulos de los patógenos entre plantas (Gilbert, 2002). Por ejemplo en un estudio realizado con plántulas del árbol neotropical *Sebastiania longicuspis*, se hicieron tratamientos con y sin fungicida, y en una densidad alta y baja de plantas para conocer el efecto de los oomycetos *Phytophthora* y *Pythium* y determinar si su incidencia era denso-dependiente. Se encontró que las plántulas sin fungicida tuvieron una mortalidad ocho veces mayor que aquellas a las que se les aplicó fungicida. Además, durante la primera semana de observación hubo una relación negativa entre la densidad de plantas y la infección por patógenos, es decir que mientras más densidad de plantas había, la infección por patógenos fue menor (Bell *et al.*, 2006). En otro ejemplo, se determinó el efecto de la densidad de plantas de maíz en la susceptibilidad al hongo *Fusarium*. Se encontró que las parcelas con mayor densidad de plantas presentaron valores significativamente mayores de enfermedad y de severidad por *Fusarium*. Sin embargo, este trabajo se realizó en poblaciones cultivadas de plantas (Blandino *et al.*, 2008). Otros estudios han mostrado que las especies de plantas filogenéticamente relacionadas tienen más probabilidad de ser susceptibles a los

mismos patógenos (Webb *et al.*, 2006; Gilbert y Webb, 2007) debido a que un patógeno que infecta a una especie puede fácilmente adaptarse a especies relacionadas filogenéticamente (Webb *et al.*, 2006). Aunque también es probable que las poblaciones de patógenos varíen con respecto a la virulencia y que respondan a las presiones selectivas ejercidas por los hospederos (Burdon, 1987; 1997).

En las comunidades naturales, las poblaciones de plantas se encuentran distribuidas en parches de tamaño variable (Burdon, 1987; 1997; Alexander, 2010). En cada parche se encuentran presentes los patógenos, aunque sus efectos pueden estar restringidos por el ambiente (Burdon, 1987; Gilbert, 2002). Como se menciona anteriormente, el principal efecto de las enfermedades fúngicas en las comunidades es el incremento o disminución de la diversidad de plantas (Burdon, 1997; Gilbert, 2002; Fournier *et al.*, 2006; Alexander, 2010). Por un lado, si la enfermedad solo afecta a la especie dominante, puede favorecer un incremento en la abundancia de otras especies. Por otro lado, si la enfermedad solo afecta a especies raras puede reducir la diversidad (Alexander, 2010). Por lo tanto, los patógenos mantienen de la diversidad de niveles taxonómicos superiores (Webb *et al.*, 2006; Gilbert y Webb, 2007).

#### **4.5. Consecuencias evolutivas de la interacción planta-patógeno**

Las relaciones que ocurren entre las poblaciones de hospederos y patógenos ha dado lugar a que se desarrolle una especie de "carrera armamentista" entre el patógeno y el hospedero: el hospedero evoluciona hacia la resistencia y el patógeno a la virulencia (Shaw, 2006). Como resultado de mutaciones y recombinaciones genéticas, las plantas hospederas expresan genes en respuesta a los patógenos y a sus vectores, a los cambios en los vectores y a cambios en los patógenos (Trevathan, 2004). Los sistemas reproductivos de los patógenos son diferentes de los de sus hospederos. Muchos no poseen procesos sexuales efectivos, por lo que la hibridación somática y la mutación son los mecanismos más comunes para generar variación en las poblaciones de líneas esencialmente clonales (Burdon *et al.*, 1990). Las fluctuaciones y los cambios en la estructura de las poblaciones individuales de los patógenos son consecuencia de la acción combinada de la deriva génica, la extinción y recolonización, la limitada migración entre poblaciones y la selección local (Burdon, 1997).

La hipótesis de coevolución gen a gen (Flor, 1942; 1955) se refiere a un proceso de adaptación recíproco entre especies concretas y en el que un cambio en un gen de resistencia en la especie hospedera será fijado y provocará un cambio en un gen de virulencia en la especie patógena (Leonard, 1987; Thompson, 1990). Por ejemplo, en una población de hospederos que se distribuye en parches no muy separados, donde cualquier parche tiene la misma probabilidad de ser dominado por un solo patógeno aislado y existen variaciones tanto en intensidad como en dirección de las presiones selectivas ejercidas por los hospederos sobre los patógenos y por los patógenos sobre los hospederos de un parche a otro. Es posible que ocurra una asociación coevolutiva a largo plazo entre hospedero y patógeno mediante la suma de todos los parches (Burdon *et al.*, 1990). Una asociación coevolutiva entre el hospedero y el patógeno puede tener grandes efectos sobre otros patógenos y llevar a la reducción en el número total de patógenos que coexisten en un solo hospedero (Shaw y Peters, 1994).

Las poblaciones de patógenos deben tener variación genética sobre la cuál pueda actuar la selección ejercida por las especies hospederas, mientras que para la selección de plantas hospederas por parte de los patógenos se requiere variación de la virulencia en la población del patógeno dentro del hospedero (Leonard, 1987). Los genes de resistencia y virulencia requieren la presencia de unos y otros dentro de la población para ser mantenidos por selección natural (Thompson, 1990). Si la resistencia del hospedero se reintroduce o se introduce dentro de una nueva área, es probable que la población del patógeno que lleva el alelo de la virulencia correspondiente se vuelva común (Shaw, 2006). Muchos alelos de la virulencia tienen desventajas selectivas en ausencia de la resistencia correspondiente pero pueden persistir en frecuencias moderadas por mucho tiempo (Thompson, 1990; Shaw, 2006). Sin embargo, en poblaciones pequeñas donde la diversidad genética del hospedero es altamente restringida, el ciclo de vida es corto y la mayoría de los patógenos tienen una alta fecundidad, una sola raza virulenta puede dominar rápidamente como resultado de la deriva génica y la selección direccional (Burdon *et al.*, 1990).

Cuando un patógeno virulento alcanza un área con hospederos susceptibles, la enfermedad tiende a ser severa (Burdon, 1997; Scheffer, 1997). Con el tiempo, la población hospedera se vuelve tolerante y el patógeno tiende a ser menos virulento. La resistencia en una población que no se expone por mucho tiempo al patógeno tiende a desaparecer, mientras que en una población constantemente expuesta se mantiene

(Scheffer, 1997). El número de patógenos presentes en las poblaciones de hospederos aumenta mediante el incremento en la virulencia y en los cambios en la patogenicidad (Burdon, 1997; Scheffer, 1997). Por el contrario, cuando los hospederos adquieren nuevos genes para la resistencia disminuyen las poblaciones de los patógenos (Scheffer, 1997).

## 5. Sistema biológico

*Datura stramonium* L. (Solanaceae)

Se conoce con el nombre común de Toloache. Es una hierba anual erecta que alcanza hasta 2 m de altura (Figura 1). Su propagación es sólo por semillas. Se ramifica dicotómicamente, tiene hojas grandes de bordes irregularmente dentados, color verde oscuro y con pecíolos muy grandes. Las hojas al frotarse despiden un olor desagradable. Las flores son tubulares, de color violáceo o blanco. El fruto es una cápsula espinosa dehiscente (en cuatro valvas) y con muchas semillas oscuras, reniformes (Weaver y Warwick, 1984; Núñez Farfán, 1991). Es originaria de las regiones tropicales de América Central y del Sur aunque también se reportan ejemplares en el este de Norte América (Weaver y Warwick, 1984). Tiene una amplia distribución geográfica, principalmente en México y Estados Unidos (Weaver y Warwick, 1984; Núñez Farfán, 1991). Su hábitat se caracteriza por presentar perturbación humana, particularmente en lugares donde la vegetación es removida, como basureros, terrenos baldíos, a orillas de los caminos y en campos de cultivo abandonados (Weaver y Warwick, 1984; Núñez-Farfán 1991). Dentro de los herbívoros que la atacan se encuentran: *Lema trilineata*, *Trichobaris soror*, *Sphenarium purpuracens*, *Epitrix parvula* y un lepidóptero no identificado (Núñez-Farfán, 1991). En algunos estudios se indica que el daño foliar producido por insectos herbívoros varía entre poblaciones y reduce la adecuación de las plantas (Núñez-Farfán y Dirzo, 1994; Valverde *et al.*, 2001; 2003; Fornoni *et al.*, 2004), también se ha encontrado variación en los niveles de resistencia (Núñez-Farfán y Dirzo, 1994; Valverde *et al.*, 2001). Los hongos patógenos que le causan enfermedades en Norte América son: *Alternaria crassa*, *Alternaria solani*, *Cercospora daturicola*, *Diplodia atro-caerulea*, *Phyllosticta hortorum* y *Septoria lycopersici* (Weaver y Warwick, 1984).

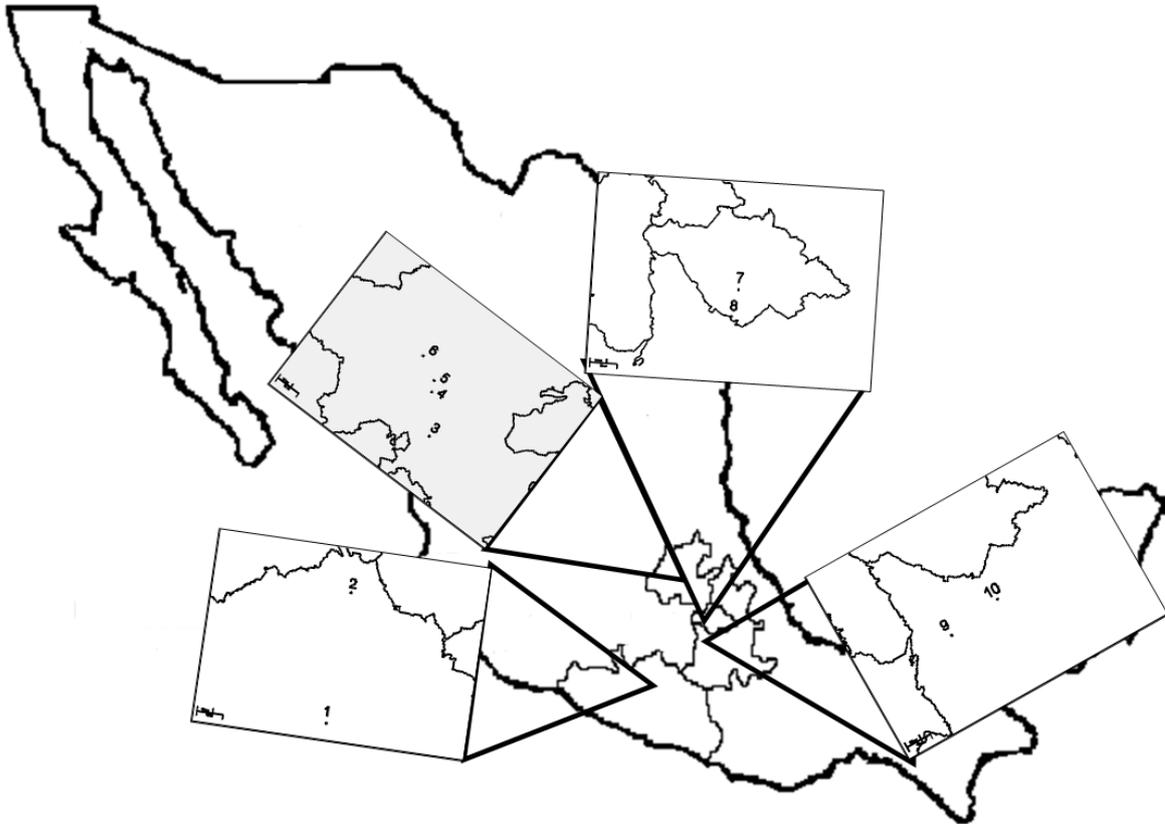


**Figura 1. *Datura stramonium* L.**

## **6. Métodos**

### **6.1. Área de estudio**

El presente estudio se realizó en 10 poblaciones de *D. stramonium* localizadas en los estados de Guerrero, Hidalgo, Tlaxcala y Puebla. De las 10 poblaciones, dos se ubicaron en Guerrero: Xochipala y Rancho de Colores; cuatro en Hidalgo: San Agustín Tlaxiaca, Francisco Villa, Patria Nueva y Peña Dos; dos en Tlaxcala: Magdalena de Tlaltelulco y Panzacola; y finalmente dos en Puebla: Atlixco y Valsequillo (Figura 2). La ubicación geográfica y las características ambientales de cada uno de los sitios se muestran en la Tabla 1 (Anexo).



**Figura 2. Localización de las poblaciones de estudio en los estados de Guerrero, Hidalgo, Tlaxcala y Puebla. Los sitios numerados son 1-Xochipala, 2-Rancho de Colores, 3-San Agustín Tlaxiaca, 4-Francisco Villa, 5-Patria Nueva, 6-Peña Dos, 7-Magdalena de Tlaltelulco, 8-Panzacola, 9-Atlixco y 10-Valsequillo.**

## **6.2. Análisis de los niveles de daño causado por hongos patógenos a *D. stramonium***

Se analizaron 40 individuos en cada población con el fin de determinar los niveles de daño causados por hongos en hojas. Para cada individuo se obtuvieron los siguientes parámetros: altura, número de hojas, número de hojas con daño por hongos, número de hojas con daño por herbívoros y número de frutos. Las hojas de los individuos que mostraron evidencia de ataque se colectaron con el fin de evaluar el nivel de daño foliar usando un sistema de análisis de imágenes *WinFOLIA* (Regent Instruments Canadá INC.). El análisis del daño foliar incluyó los parámetros: área foliar total, área foliar dañada por hongos y por insectos herbívoros. Las hojas se analizaron en fresco con el fin de describir los síntomas causados por hongos y la posible asociación entre el daño por hongos y por insectos herbívoros. Además, se tomó una muestra de hojas con evidencia de ataque por hongos con el fin de aislar e identificar a los agentes causales del daño.

### **6.3. Medición de los factores ambientales de cada sitio**

Los sitios seleccionados se encontraban en terrenos baldíos, tiraderos de basura y escombro, por lo que no fue posible colocar HOBOS para cuantificar la temperatura y la precipitación. Por lo tanto, se tomó la ubicación de cada población con un GPS (Global Positioning System - Sistema de Posicionamiento Global). La ubicación de los sitios se encontraba en coordenadas UTM (Universal Transverse Mercator – Universal Transversal de Mercator), las cuáles se transformaron a coordenadas geográficas para localizarlas en el mapa. Una vez localizados los puntos se consultó un mapa del clima para extrapolar los datos de la temperatura y la precipitación media anual de cada sitio (Tabla 1). Debido a que eran sitios abiertos no se cuantificó la intensidad lumínica.

### **6.4. Aislamiento de los hongos patógenos que atacan a *D. stramonium***

Para el aislamiento de los agentes causales de daño, se cortaron secciones de la hoja a nivel del límite de la lesión. Estos fragmentos se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio al 1 % durante 2 min y se enjuagaron con agua desionizada estéril. Después se colocaron sobre papel filtro estéril para eliminar el exceso de agua. A continuación se sembraron en medio de papa-dextrosa-agar (PDA) (García-Guzmán, 1986; 1990). Los cultivos se incubaron a temperatura ambiente hasta observar el desarrollo y la esporulación del hongo (Ulloa y Hanlin, 1978). Posteriormente, se purificaron los aislados para identificarlos con base en la morfología microscópica de los conidios y poder realizar pruebas de patogenicidad siguiendo los postulados de Koch (Agrios, 1997). La identificación a nivel de género se hizo comparando la morfología colonial con las imágenes del manual ilustrado de géneros de hongos imperfectos de Barnett y Hunter (1972).

Debido a que no fue posible la identificación a nivel de especie con base en la morfología microscópica de los conidios, se realizó un análisis mediante la extracción de ADN de cada aislado. Para la extracción de ADN, se realizaron cultivos puros a partir de una sola espora de cada cepa. Los cultivos monospóricos se realizaron en el laboratorio de Micología Básica de la Dra. Concepción Toriello Nájera, del departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la UNAM.

La extracción, amplificación, purificación y secuenciación se llevó a cabo en el laboratorio del Dr. Javier Plasencia de la Parra, del departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la UNAM.

#### **6.4.1. Obtención de cultivos monospóricos**

Para la obtención de cultivos puros a partir de una sola espora, primero se preparó una suspensión de conidios en Tween 80 al 0.5 %. Éstos se cuantificaron en una cámara de Neubauer para realizar diluciones hasta obtener una suspensión de  $1 \times 10^3$  conidios/mL. Después se preparó un portaobjetos estéril con 3 mL de agarosa al 0.8 % estéril sobre un triángulo de vidrio, dentro de una caja de Petri. Se depositaron 50  $\mu$ L de la suspensión de conidios previamente diluida sobre la agarosa solidificada y se esparcieron los conidios con una varilla de vidrio estéril. Se dejaron pasar 15 min para que la agarosa absorbiera el líquido. La suspensión de conidios también puede hacerse utilizando cajas de Petri con medio de agarosa, gelatina y dextrosa (AGD) (Mier *et al.*, 2002). El medio translúcido permitió localizar con facilidad los conidios al realizar las observaciones en el microscopio óptico. En el reverso de la caja de Petri se trazó un cuadrulado con cuadrantes de 1 cm<sup>2</sup> (Ayala-Zermeño, 2006). Posteriormente se revisó el portaobjeto o la caja de Petri con el objetivo de 10 X del microscopio para localizar un conidio y se verificó con el objetivo de 40 X. Una vez que se verificó, se regresó al objetivo de 10 X y se ubicó el conidio en el centro del campo visual. Se bajó el revólver del microscopio con el tornillo macrométrico, se cerró el diafragma hasta que solamente se observó un pequeño haz de luz sobre la región donde se localizó el conidio. Se realizaron pequeños cortes con un bisturí en forma de un cuadrado en torno a la circunferencia del haz de luz. Se tomó la fracción de agarosa con el conidio único y se colocó en una caja de Petri con PDA y se incubó a 28 °C. La caja se revisó diariamente hasta obtener el aislado monospórico. Una vez obtenido, se conservó sembrándolo en una nueva caja con PDA (Agar Papa–Dextrosa) (Mier *et al.*, 2002).

#### **6.4.2. Extracción de ADN**

A los cultivos monospóricos se les agregaron 10 mL de Tween 80 al 0.5 % para preparar una suspensión de conidios. Posteriormente se tomaron 10 mL de la

suspensión y se agregaron al medio líquido de Sabouraud–Dextrosa adicionado de extracto de levadura al 1 %. Los cultivos se incubaron en agitación a 26 °C por tres días. La extracción de ADN genómico se hizo con DNAzol (GIBCO-BRL). Primero se tomaron 5 mL de cada cultivo monospórico líquido y se calentaron a 80 °C por 10 min, luego se enfriaron con nitrógeno líquido y se centrifugaron durante 5 min a 12,000 rpm. Se le agregó 1 mL de DNAzol a cada muestra, y se homogeneizaron agitando los tubos por inversión 10 veces. No es recomendable hacerlo muy fuerte ya que se puede romper el ADN. Cada tubo se dejó durante 3 min a temperatura ambiente. Después se centrifugaron 10 min a 10,000 rpm a temperatura ambiente para eliminar los restos de tejido. Se pasaron los sobrenadantes a tubos limpios usando puntas de pipeta de 1 mL ensanchadas de la boca. A cada tubo con el sobrenadante se le agregó 0.5 mL de isopropanol a -20 °C y se mezclaron por inversión. Los tubos se incubaron a temperatura ambiente por 3 min, posteriormente se centrifugaron durante 10 min a 10,000 rpm a 4 °C y se eliminó el sobrenadante por decantación. Se dejó secar el precipitado dejando los tubos abiertos por 15 min y se le agregó a cada tubo 40 µL de agua estéril.

#### **6.4.3. Amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) del ADN genómico**

Para realizar la amplificación del ADN genómico extraído se utilizó el método de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) empleando los oligonucleótidos ITS1 (5´-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3´) y ITS2 (5´-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3´). Las condiciones de la PCR se realizaron de acuerdo con lo reportado por Kang *et al.* (2010) en un volumen final de reacción de 20 µL. Se emplearon 4 µL de buffer 5X, MgCl<sub>2</sub> a 2.5 mM, 0.4 µL de dNTP´s a 200 µM (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, EUA), 0.4 µL de oligo Fw a 0.4 µM, 0.4 µL de oligo Rv a 0.4 µM, 1 µL de ADN, 0.5 µL de Taq polimerasa a 0.25 µL (Applied Biosystems) y 13.3 µL de agua estéril. Se utilizó un tubo por cada muestra de ADN. La amplificación se realizó en el termociclador Gene Amp PCR System 9700 (PE Applied Biosystems) con la siguiente programación: 3 minutos a 94 °C, 34 ciclos de 40 segundos a 94 °C, 40 segundos a 56 °C y 40 segundos a 72 °C, y finalmente 7 minutos a 72 °C. Una vez que terminó la amplificación se guardaron las muestras a 4 °C. Después se analizaron las muestras mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % con SyBR-Safe (50 µg/mL), en amortiguador TBE 0.5 X (Tris-Base a 45

mM, ácido bórico a 45 mM, EDTA a 1 mM). Cuando se verificó que se realizó la amplificación de las muestras de ADN, se volvió a aplicar el método de PCR utilizando cuatro tubos por cada muestra con las mismas condiciones y cantidades de buffer, dNTP's, Oligos, ADN, Taq polimerasa y agua estéril. Las muestras se volvieron a correr mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % para la purificación del ADN.

#### **6.4.4. Purificación y secuenciación del fragmento de ADN producido en la PCR**

La purificación consistió en colocar el volumen de la mezcla de reacción (aproximadamente 20 µL) de cada tubo junto con amortiguador de carga, en un gel de agarosa al 1% con SyBR-Safe. La electroforesis se llevó a cabo a 100 V, en amortiguador TBE 0.5X, durante un tiempo aproximado de 90 min. Una vez concluida, se observó el gel a través de un transiluminador de luz UV. Previamente se pesaron tubos Eppendorf de 1.5 mL y se anotó el peso. Las bandas del gel de agarosa de cada muestra se cortaron eliminando el exceso y se depositaron en los tubos Eppendorf y se volvieron a pesar. La diferencia del peso final con el peso inicial fue el volumen total de la muestra en el gel. La purificación se realizó con el kit QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen GMBH, Hilden, Alemania), de acuerdo con las instrucciones descritas por el fabricante. A cada tubo se le agregaron 3 volúmenes de Buffer QG por cada 1 de muestra en el gel. Los tubos se dejaron incubar a 50 °C por 10 min. Después de que el gel se disolviera por completo, se observó que el color de la mezcla fuese amarillo ya que la adsorción de ADN a la membrana QIAquick es eficiente sólo a pH 7.5 (el color amarillo es un indicador del pH adecuado en la mezcla). Una vez disuelto el gel los tubos se agitaron y se agregaron 100 µL de isopropanol. Se colocó la columna QIAquick spin en un tubo colector de 2 mL, para unir el DNA, se agregaron 800 µL de cada muestra en la columna QIAquick y se centrifugó durante 1 min a 13,000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se volvió a centrifugar durante 1 min hasta que se terminó la muestra. Posteriormente se adicionaron 500 µL de Buffer QG a la columna QIAquick (para la remoción de posibles restos de agarosa) y se centrifugó por 1 min a 13,000 rpm. Se descartó el sobrenadante. Después, para lavar la muestra, se agregaron 750 µL de Buffer PE del kit a la columna y se centrifugó por 1 min a 13,000 rpm. Se descartó el sobrenadante y fue centrifugado nuevamente durante 1 min a 13,000 rpm para remover por completo el isopropanol residual del Buffer PE. Cada columna QIAquick se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL estéril para eluir el ADN, se

agregaron 20  $\mu\text{L}$  de agua MilliQ y se mantuvo la columna por 2 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó por 1 min a 13,000 rpm, obteniéndose así el ADN purificado de la amplificación previa. Para la cuantificación de ADN se utilizó un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Al espectrofotómetro se le agregó 1  $\mu\text{L}$  de muestra de cada tubo en una celda y se cuantificó en nanogramos por microlitro. Para cuantificar una nueva muestra fue necesario agregar agua destilada hasta que la celda quedó libre de residuos de ADN de la muestra anterior. Una vez que se obtuvieron los niveles de ADN en cada muestra purificada, se volvió a realizar una electroforesis con gel de agarosa al 1 % agregando 2  $\mu\text{L}$  de muestra. El gel se observó con una lámpara de UV y se fotografió. La fotografía del gel junto con los tubos con la muestra purificada y la concentración de ADN presente en cada uno se mandaron a secuenciar en un secuenciador ABI (Applied Biosystems, Perkin-Elmer, CA, EU), en el Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Para el alineamiento, una vez que se obtuvieron los resultados de la secuenciación de las regiones ITS 1 y 2, se consultó la página del NCBI (National Center for Biotechnology Information) con el algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 2.2.23 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) (Altschul *et al.*, 1997). Se compararon con las secuencias de nucleótidos pertenecientes a los hongos depositados en el GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov>) hasta ese momento. Como criterio se consideró la búsqueda de secuencias de la colección de nucleótidos (nr/nt), optimizada para secuencias altamente similares (megablast) con el fin de determinar la identidad máxima con alguna especie que tuviera la misma secuencia.

### **6.5. Pruebas de patogenicidad en plantas de *D. stramonium***

Se obtuvieron semillas al final de la época de lluvias de 2010 del sitio Rancho de Colores. Estas semillas se germinaron en el invernadero del Instituto de Ecología de la UNAM, en macetas pequeñas, con suelo comercial y se mantuvieron hasta obtener plántulas. Una vez que las plántulas se desarrollaron se transplantaron a macetas grandes. Las pruebas de patogenicidad se efectuaron para comprobar si los hongos identificados eran los responsables de las lesiones de las que fueron aislados.

### **6.5.1. Infección de las plantas de *D. stramonium***

Las hojas de las plantas que crecieron en el invernadero se desinfectaron con alcohol al 70 %. Previamente se preparó una suspensión de conidios de los hongos aislados. La suspensión de conidios de cada hongo por separado, se inoculó de acuerdo a tres métodos: aspersión, herida y contacto (García-Guzmán, 1986; 1990). El método de aspersión consistió en asperjar la suspensión de conidios en los sitios elegidos para la prueba (García-Guzmán, 1990). En el método por herida se realizó una ligera incisión o un raspado superficial en la lámina de la hoja y se inoculó directamente mediante una aguja de disección una pequeña cantidad de la colonia en estudio. Finalmente en el método por contacto se colocaron trocitos de algodón humedecidos en la suspensión de conidios sobre la hoja elegida para la prueba (García-Guzmán, 1986; 1990). Una vez inoculadas las hojas, se cubrieron con una bolsa de plástico por 24 h con el fin de incrementar la humedad y favorecer la germinación de las esporas y la penetración del patógeno en el tejido del hospedero (García-Guzmán, 1990). Los individuos se revisaron cada 24 h hasta observar la manifestación de síntomas. Al final del experimento se colectaron las hojas para aislar e identificar al agente causal y corroborar que corresponde al inicialmente inoculado mediante el método previamente citado (García-Guzmán, 1986; 1990).

### **6.5.2. Efecto del hongo en el desempeño y en el éxito reproductivo en plantas de *D. stramonium***

Después de las inoculaciones con cada hongo por separado se determinó cual fue el hongo más exitoso basándose en la rapidez con que se desarrollaron los síntomas de la enfermedad que causa. Una vez que se obtuvo al patógeno más exitoso se iniciaron los experimentos utilizando solo ese hongo para determinar su efecto en el desempeño y éxito reproductivo de las plantas de *Datura*. Los tratamientos utilizados para este experimento fueron la inoculación, por medio de una herida, de la suspensión de conidios del hongo seleccionado en 25, 50, 75 y 100 % de las hojas de cada planta. Para las plantas testigo se emplearon los mismos tratamientos pero usando agua estéril en lugar de la suspensión de conidios. Se realizaron cinco repeticiones por tratamiento. Además, se dejaron cinco plantas sin ningún tratamiento como testigo absoluto. A cada planta se le midió la altura, el diámetro, el número de hojas, el número de flores y el número de frutos, antes de iniciar los tratamientos y durante

cada semana hasta que concluyó el experimento (22 semanas). Durante el experimento, se cuantificaron las semillas de las plantas que tuvieron frutos maduros.

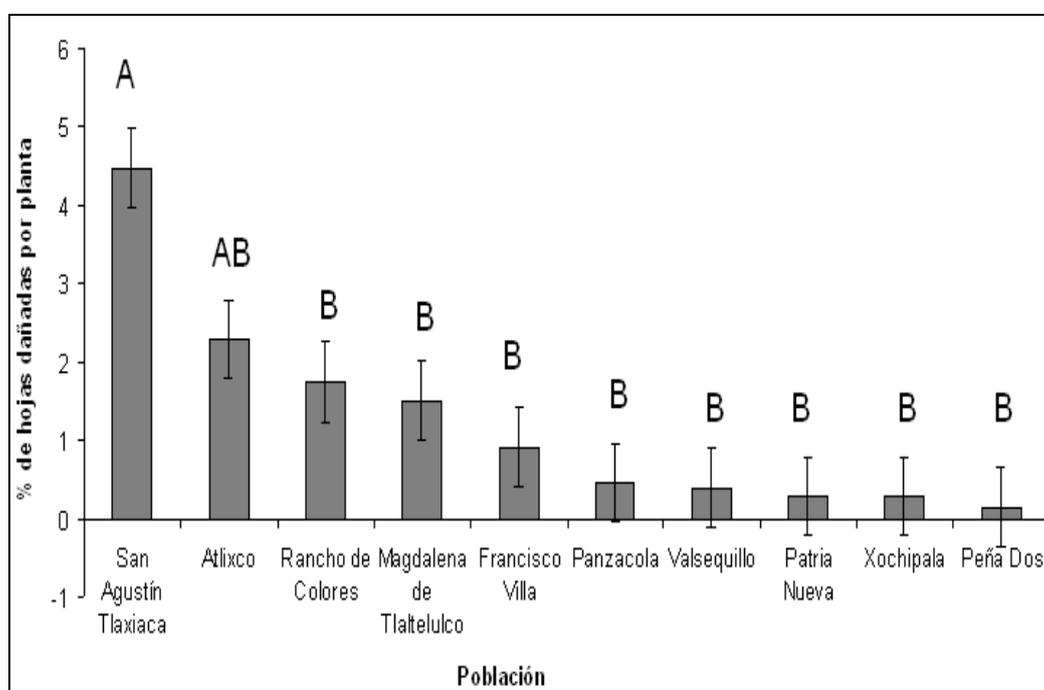
## **6.6. Análisis estadístico**

Para buscar diferencias entre sitios de los valores del porcentaje de hojas dañadas por hongos por planta, de los porcentajes de área foliar dañada por hongos por planta, del número de frutos, la altura y del porcentaje de hojas dañadas por herbivoría se aplicaron pruebas de Wilcoxon / Kruskal-Wallis. Para poder agrupar los sitios se empleó una prueba de Tukey / Kramer. Los valores del número de frutos, la altura y del porcentaje de hojas dañadas por herbivoría se transformaron en logaritmos debido a que el valor de la varianza fue mayor al valor de las medias (Zar, 1984). Además, se llevaron a cabo correlaciones simples entre los valores por sitio de los siguientes factores ambientales: temperatura media anual, precipitación media anual, porcentaje de hojas dañadas por herbivoría, número de frutos y altura, con el porcentaje de hojas dañadas por hongos y el porcentaje de área foliar dañada por hongos. Asimismo, se correlacionaron entre sí los porcentajes de hojas dañadas por hongos y del área foliar dañada por éstos. Además, se hicieron correlaciones simples con los valores por individuo por sitio de los factores: porcentaje de hojas dañadas por herbivoría, número de frutos y altura, con el porcentaje de hojas dañadas por hongos y el porcentaje de área foliar dañada por éstos. Todas las correlaciones se hicieron con los valores transformados en logaritmos, excepto la de los porcentajes de hojas dañadas por hongos y del área foliar dañada por éstos. En los experimentos de invernadero se hicieron pruebas de  $X^2$  para ver si había diferencias entre tratamientos. Para agrupar los tratamientos se empleó una prueba de Tukey / Kramer. También se realizaron correlaciones simples entre los valores por tratamiento de los factores: número de hojas producidas, número de flores, número de frutos, número de semillas producidas por fruto, altura, diámetro y el área foliar dañada. Todos los análisis se realizaron con el programa *JMP* (SAS Institute Inc.).

## 7. Resultados

### 7.1. Niveles de daño foliar causado por hongos patógenos a *D. stramonium*

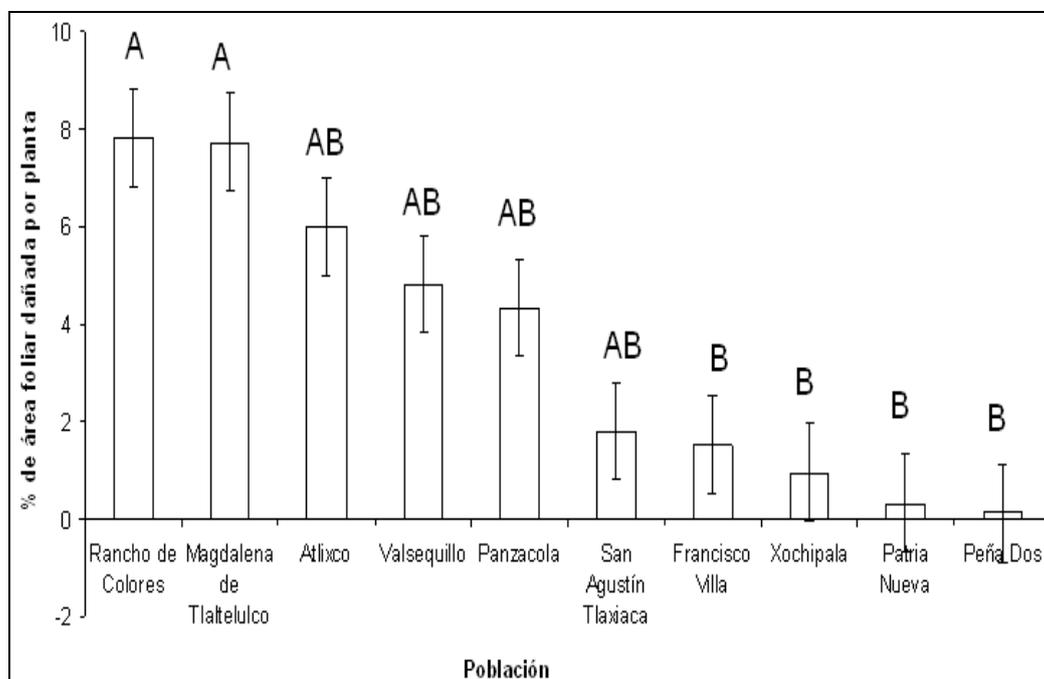
El porcentaje de hojas atacadas por hongos patógenos por planta en cada población se muestra en la Figura 3. El porcentaje de hojas dañadas por hongos patógenos por planta varió de 0.15 a 4.48 % y se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $X^2 = 29.73$ ;  $gl = 9$ ;  $P = 0.0005$ ) entre cada población. La población que mostró un mayor porcentaje de hojas dañadas por hongos fue San Agustín Tlaxiaca, mientras que la población con menos hojas dañadas fue Peña Dos (Figura 3).



**Figura 3. Porcentaje de hojas dañadas por hongos por planta en 10 poblaciones de *Datura stramonium* localizadas en el centro de México. Letras diferentes indican diferencias entre poblaciones.**

El porcentaje de área foliar dañada por hongos por planta en cada población se muestra en la Figura 4. En este caso, los porcentajes de área foliar dañada por hongos por planta en cada población variaron de 0.13 a 7.81 % y se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $X^2 = 57.33$ ;  $gl = 9$ ;  $P = <0.0001$ ) entre cada población. Las poblaciones de Rancho de Colores, Magdalena de Tlaltelulco, Atlixco, Valsequillo y

Panzacola mostraron un mayor porcentaje de área foliar dañada por hongos por planta y la población de Peña Dos fue la que presentó el menor porcentaje (ver Figura 4).



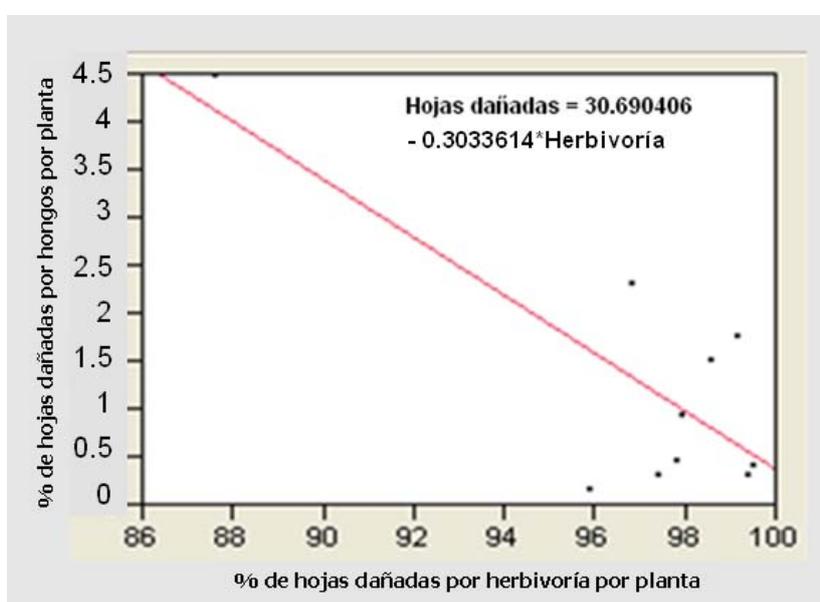
**Figura 4. Porcentaje de área foliar dañada por hongos por planta en 10 poblaciones de *Datura stramonium* localizadas en el centro de México. Letras diferentes indican diferencias entre poblaciones.**

## **7.2. Relación de los factores ambientales con los niveles de daño foliar de *D. stramonium***

Los valores promedio de cada factor ambiental por población se muestran en la Tabla 2 (Anexo). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre sitios para los factores altura, número de frutos, porcentaje de hojas dañadas por herbivoría y porcentaje de área foliar dañada por herbivoría (Tabla 3). Los resultados de las correlaciones entre los valores de los factores por sitio junto con el valor de la probabilidad se muestran en la Tabla 4 (Anexo). Los resultados de las correlaciones con los valores de los factores por individuo por sitio junto con el valor de la probabilidad se muestran en la Tabla 5 (Anexo).

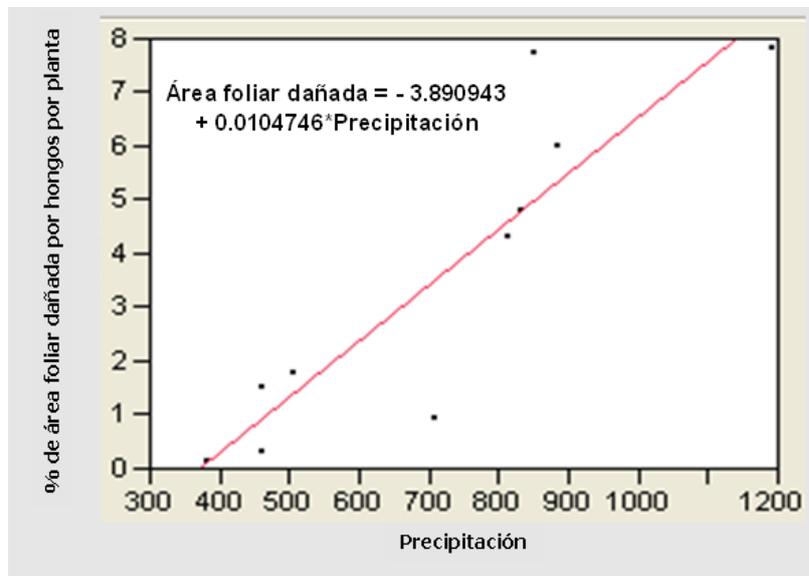
Sólo se encontraron dos correlaciones estadísticamente significativas en los valores de los factores por sitio. La primera fue entre el porcentaje de hojas dañadas por hongos con el porcentaje de hojas dañadas por herbivoría ( $R^2 = 0.625$ ;  $P = 0.007$ )

(Figura 5). Los análisis entre los valores por sitio, indican que el porcentaje de hojas dañadas por hongos por planta se relacionó negativamente con el daño por herbívoros, es decir, que las hojas que tuvieron menos daño por hongos presentaron más daño por herbívoros. Sin embargo, como se observa en la Figura 5, solo una de las poblaciones se encuentra en la parte superior izquierda y las nueve restantes se localizan en la parte inferior derecha por lo que se eliminó la población separada y se realizó de nuevo el análisis de correlación. Al realizar nuevamente el análisis de correlación ya no fue significativo ( $R^2 = 0.0003$ ;  $P = 0.966$ ).



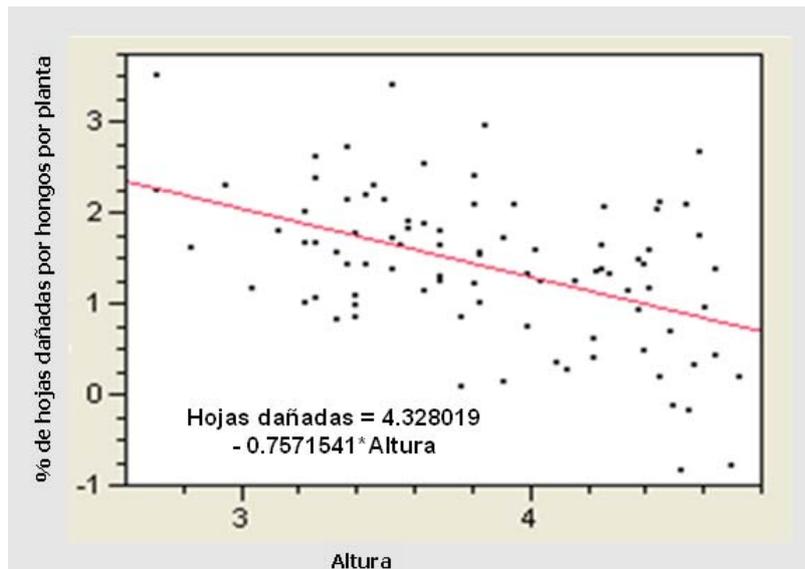
**Figura 5. Relación entre el porcentaje de hojas dañadas por hongos y el porcentaje de hojas dañadas por herbivoría en poblaciones de *Datura stramonium* localizadas en el centro de México ( $R^2 = 0.625$ ;  $P = 0.007$ ).**

La segunda correlación fue entre el área foliar dañada por hongos con la precipitación media anual ( $R^2 = 0.800$ ;  $P = 0.0005$ ) (Figura 6). En este caso, el porcentaje de área foliar dañada por hongos se relacionó positivamente con la precipitación media anual, es decir, que las hojas con una mayor área foliar dañada se encontraban en sitios con mayor precipitación media anual. Por lo tanto, la relación estadísticamente significativa entre el porcentaje de área foliar dañada por hongos sugiere que los niveles diferenciales de precipitación media anual en cada población, están actuando para que se presenten variaciones en la incidencia de hongos. La temperatura media anual no influyó en las variaciones encontradas en las poblaciones.



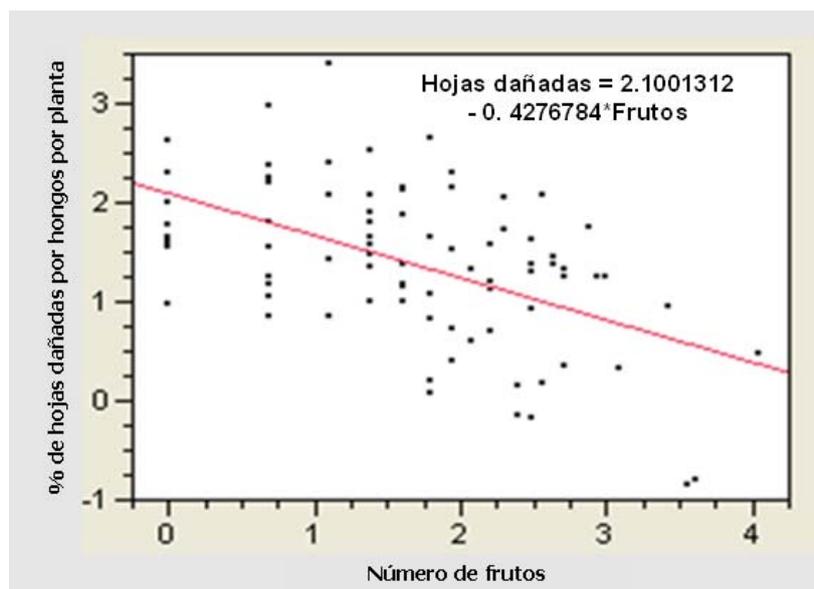
**Figura 6. Relación entre el porcentaje de área foliar dañada por hongos y la precipitación media anual en poblaciones de *Datura stramonium* localizadas en el centro de México ( $R^2 = 0.800$ ;  $P = 0.0005$ ).**

Se encontraron seis correlaciones estadísticamente significativas en los valores de los factores por individuo por sitio. Las primeras tres fueron entre el logaritmo del número de hojas dañadas por hongos con el logaritmo de la altura ( $R^2 = 0.227$ ;  $P = <0.0001$ ) (Figura 7), con el logaritmo del número de frutos ( $R^2 = 0.258$ ;  $P = <0.0001$ ) (Figura 8) y con el logaritmo del porcentaje de hojas dañadas por herbivoría ( $R^2 = 0.077$ ;  $P = 0.0086$ ) (Figura 9). En los análisis de los valores por individuo por sitio, se observó que las correlaciones entre el logaritmo del porcentaje de hojas dañadas por hongos con el logaritmo de la altura, con el logaritmo del número de frutos y con el logaritmo del porcentaje de hojas dañadas por herbivoría fueron negativas. En el primer caso se encontró que las plantas que presentaron un menor porcentaje de hojas dañadas por hongos tenían una altura mayor (Figura 7).



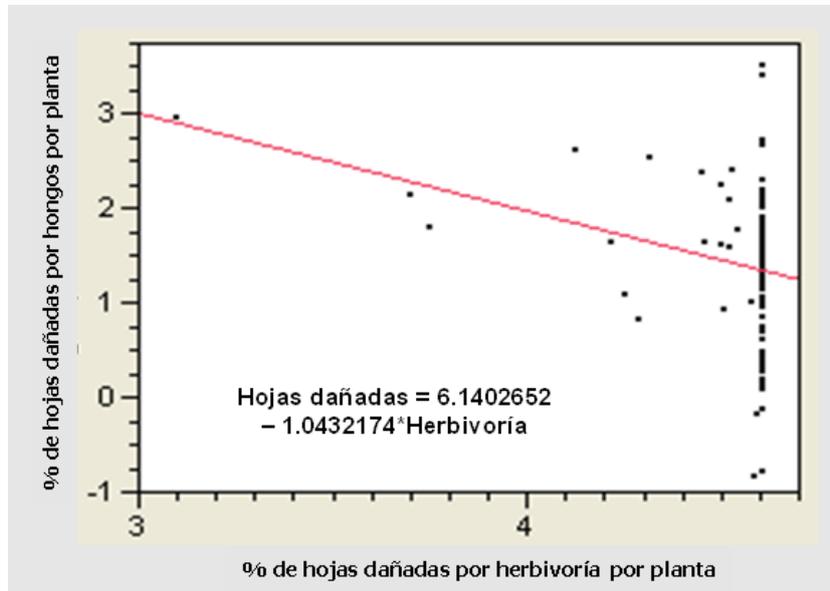
**Figura 7. Relación entre el porcentaje de hojas dañadas por hongos y la altura en poblaciones de *Datura stramonium* localizadas en el centro de México ( $R^2 = 0.227$ ;  $P = <0.0001$ ).**

En el segundo caso, se observó que las plantas que presentaron un mayor porcentaje de hojas dañadas por hongos producen un menor número de frutos en promedio (Figura 8). Por lo tanto, las relaciones estadísticamente significativas entre los primeros dos casos (Figuras 7 y 8), sugieren que la altura y el número de frutos son factores que están disminuyendo el porcentaje de hojas dañadas por hongos.



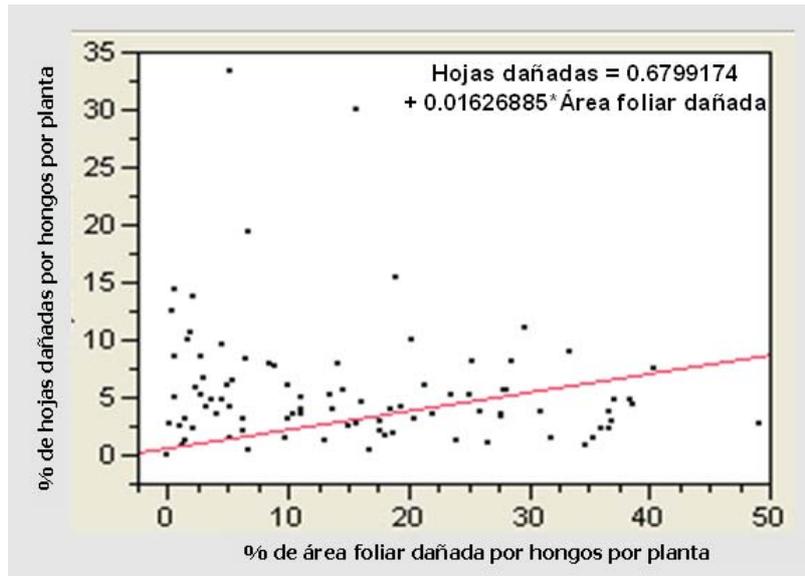
**Figura 8. Relación entre el porcentaje de hojas dañadas por hongos y el número de frutos en poblaciones de *Datura stramonium* localizadas en el centro de México ( $R^2 = 0.258$ ;  $P = <0.0001$ ).**

En el tercer caso, se encontró que el porcentaje de hojas dañadas por hongos es mayor cuando el porcentaje de hojas dañadas por herbivoría se mantienen en valores bajos (Figura 9).



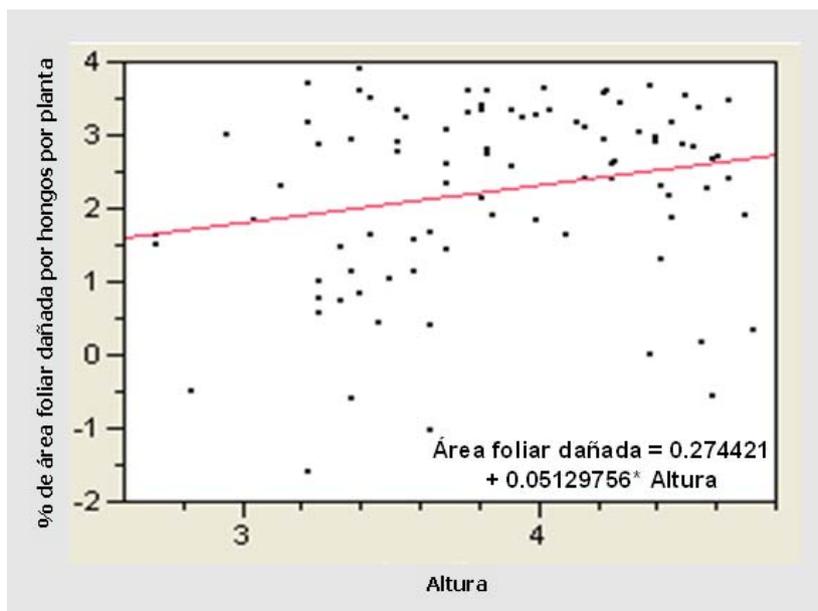
**Figura 9. Relación entre el porcentaje de hojas dañadas por hongos y el porcentaje de hojas dañadas por herbivoría en poblaciones de *Datura stramonium* localizadas en el centro de México ( $R^2 = 0.077$ ;  $P = 0.0086$ ).**

La cuarta fue entre el número de hojas dañadas por hongos con el área foliar dañada por hongos ( $R^2 = 0.175$ ;  $P = <0.0001$ ). La correlación entre el porcentaje de hojas dañadas por hongos con el área foliar dañada por hongos fue positiva, es decir, que cuando el porcentaje de hojas dañadas por hongos tuvo valores bajos, el porcentaje de área foliar dañada por hongos también (Figura 10).



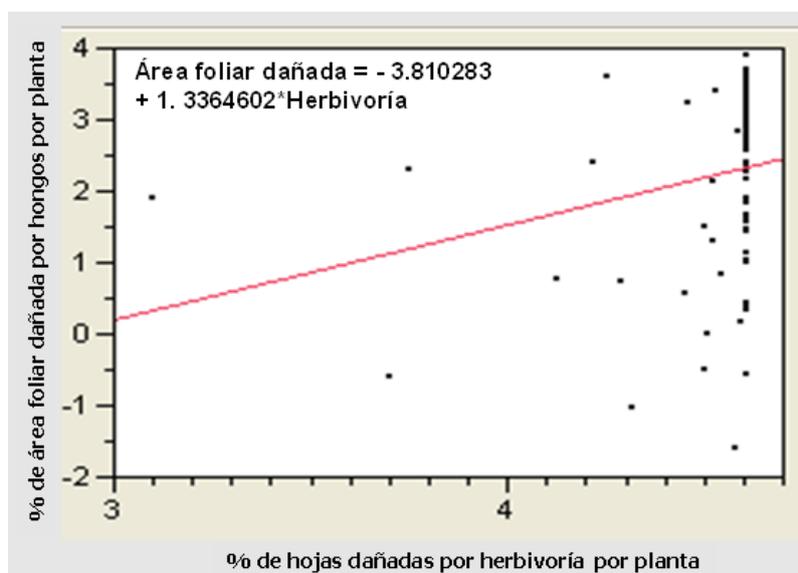
**Figura 10. Relación entre el porcentaje de hojas dañadas por hongos y el porcentaje de área foliar dañada por hongos en poblaciones de *Datura stramonium* localizadas en el centro de México ( $R^2 = 0.175$ ;  $P < 0.0001$ ).**

La quinta y la sexta fue entre el logaritmo del área foliar dañada por hongos con el logaritmo de la altura ( $R^2 = 0.045$ ;  $P = 0.045$ ) (Figura 11) y con el logaritmo del porcentaje de hojas dañadas por herbivoría ( $R^2 = 0.055$ ;  $P = 0.027$ ) (Figura 12). Las correlaciones entre el logaritmo del porcentaje de área foliar dañada por hongos con el logaritmo de la altura y con el logaritmo del porcentaje de hojas dañadas por herbivoría fueron positivas. Se encontró que el porcentaje de área foliar dañada por hongos es mayor en plantas con mayor altura (Figura 11).



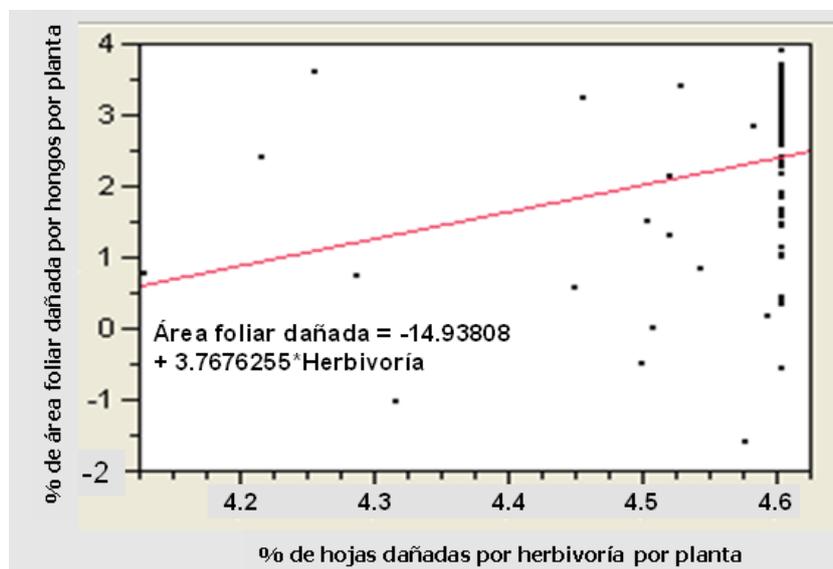
**Figura 11. Relación entre el porcentaje de área foliar dañada por hongos y la altura en poblaciones de *Datura stramonium* localizadas en el centro de México ( $R^2 = 0.045$ ;  $P = 0.045$ ).**

Finalmente, se encontró que las plantas que presentaron un mayor porcentaje de hojas dañadas por hongos también tuvieron un alto porcentaje de hojas dañadas por herbivoría (Figura 12).



**Figura 12. Relación entre el porcentaje de área foliar dañada por hongos y el porcentaje de hojas dañadas por herbivoría en poblaciones de *Datura stramonium* localizadas en el centro de México ( $R^2 = 0.055$ ;  $P = 0.027$ ).**

Sin embargo, en el caso de las correlaciones entre el porcentaje de hojas dañadas por hongos y el porcentaje de área foliar dañada por hongos con el porcentaje de hojas dañadas por herbivoría se observa que sólo tres de los individuos se encuentran en la parte superior izquierda y el resto se concentra en la parte derecha (Figuras 9 y 12), por lo que se eliminaron también las tres poblaciones y se realizó nuevamente el análisis de correlación entre estos valores con el porcentaje de hojas dañadas por hongos y con el porcentaje de área foliar dañada por hongos. El segundo análisis de correlación con el porcentaje de hojas dañadas por hongos ( $R^2 = 0.0314$ ;  $P = 0.103$ ) no fue significativo, mientras que con el porcentaje de área foliar dañada por hongos ( $R^2 = 0.0769$ ;  $P = 0.0097$ ) sí fue significativa (Figura 13). La correlación entre el porcentaje de área foliar dañada por hongos con el porcentaje de hojas dañadas por herbivoría fue positiva por lo que se observó que las plantas con un mayor porcentaje de área foliar dañada por hongos también presentaron un porcentaje de hojas dañadas por herbivoría alto. La relación estadísticamente significativa entre el porcentaje de área foliar dañada por hongos con la altura y con el porcentaje de hojas dañadas por herbivoría son factores que favorecen la incidencia de hongos en las plantas de *D. stramonium*.



**Figura 13. Relación entre el porcentaje de área foliar dañada por hongos y el porcentaje de hojas dañadas por herbivoría en poblaciones de *Datura stramonium* localizadas en el centro de México ( $R^2 = 0.077$ ;  $P = 0.0097$ ).**

### **7.3. Identificación de los hongos patógenos que atacan a *D. stramonium***

A partir de los daños observados en todas las poblaciones y de las comparaciones hechas con un manual ilustrado de géneros de hongos imperfectos (Barnett y Hunter, 1972), se identificaron tres géneros de hongos: *Alternaria* sp., *Epicoccum* sp. y *Phoma* sp. En *D. stramonium*, *Alternaria* sp. causa manchas irregulares de color café claro con un halo necrótico delgado; *Epicoccum* sp. produce manchas necróticas irregulares color café rojizo; y *Phoma* sp. fue aislada de manchas irregulares de color café oscuro con un halo necrótico grueso. Los tres géneros pertenecen al Phylum Ascomycota, Clase Dothideomycetes, Orden Pleosporales, Familia Pleosporaceae (Hibbett *et al.*, 2007; McLaughlin *et al.*, 2009). No se pudo llegar a nivel de especie en ningún caso, debido a que las muestras de *Alternaria* sp. y *Epicoccum* sp. se contaminaron durante la secuenciación. En el caso de *Phoma* una de las secuencias obtenidas del fragmento de ADN producido en la PCR (Figura 14) tuvo un 100 % de identidad máxima con dos especies (*P. tropica* y *P. macrostoma*) (Figura 15) por lo que es necesario amplificar y secuenciar otros genes que permitan definir a las especies dentro del género *Phoma*. En el caso de *Alternaria* sp. y *Epicoccum* sp. es necesario volver a realizar los análisis de PCR. La descripción de los tres géneros se muestra en la Figura 16.

Género	Descripción	
<i>Alternaria</i> Nees.	Conidióforos negros, la mayoría simples, cortos o alargados, típicamente forman cadenas simples o ramificadas de conidios; conidios (poroesporas) negros, típicamente con septos tanto transversales como longitudinales; de forma variable, de elípticos a ovoides, frecuentemente nacen acropétalmente en largas cadenas, en algunos casos nacen individualmente y tienen un apéndice apical simple o ramificado; parásitos o saprobios en material vegetal (Barnett y Hunter, 1972).	
<i>Epicoccum</i> Link.	Esporodocios negros, más o menos con forma de cojín, variables en tamaño; conidióforos compactos o sueltos, negros, más bien cortos; conidios negros, de una célula (dictioesporas), globosas; la mayoría saprobios (Barnett y Hunter, 1972).	
<i>Phoma</i> Desm.	Picnidios negros, ostiolados, lenticulares o globosos, inmersos en el tejido del hospedero, con una punta corta que perfora la epidermis; conidióforos cortos; conidios pequeños, de una célula, hialinos ovoides o alargados; parásitos, producen manchas, principalmente en las hojas; parásitos, en varias partes de la planta (Barnett y Hunter, 1972).	

**Figura 16. Descripción de los tres géneros de hongos aislados de las poblaciones de *Datura stramonium*.**

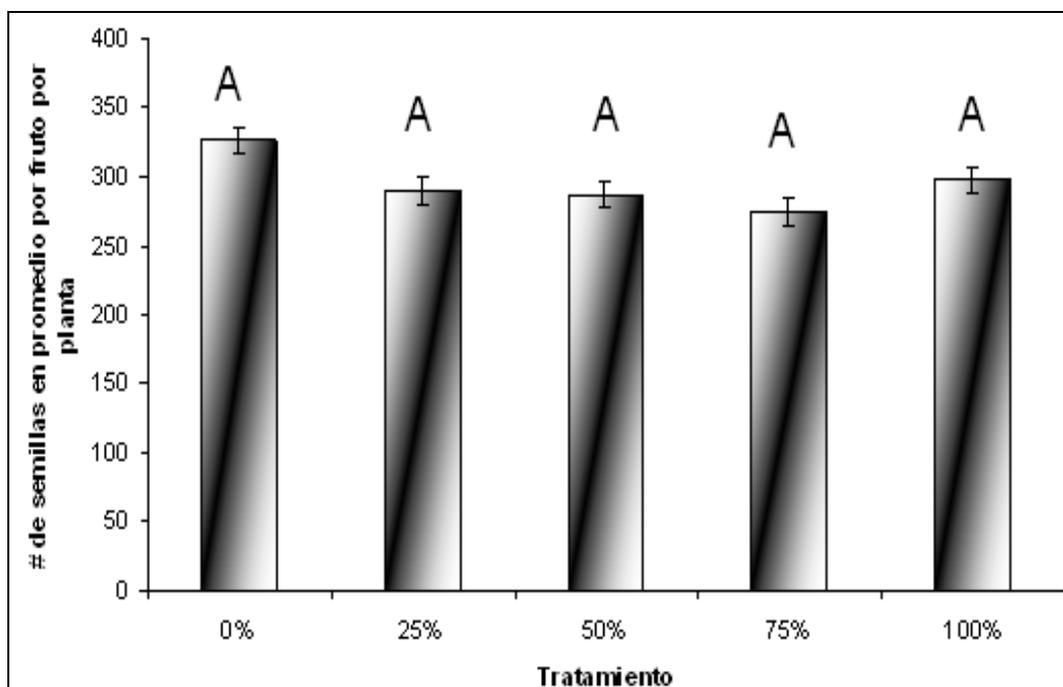
#### **7.4. Pruebas de patogenicidad y efecto de los hongos patógenos en el desempeño y en el éxito reproductivo en plantas de *D. stramonium***

Se realizaron pruebas de patogenicidad en tres plantas de semillas obtenidas de la población Rancho de Colores. Las pruebas se hicieron utilizando los tres hongos aislados de las poblaciones de *D. stramonium*. Se probaron las tres técnicas de inoculación descritas previamente. El hongo que causó los síntomas más rápidamente fue *Alternaria* sp., en cuatro días, y produjo manchas necróticas irregulares de color café claro. Por lo tanto, los experimentos para determinar el efecto del patógeno en el desempeño y el éxito reproductivo de *D. stramonium* se realizaron con este hongo.

En general, el porcentaje en promedio de área foliar dañada de las plantas infectadas con *Alternaria* sp. durante las pruebas de patogenicidad fue de 4.5 %  $\pm$  2.5 EE. Los tratamientos con los diferentes porcentajes de hojas inoculadas con *Alternaria* sp. en el invernadero así como el síntoma desarrollado por las plantas se muestran en la Figura 17 (Anexo). Los valores promedio por tratamiento del número de hojas, flores, y frutos por planta, de la altura, el diámetro y el área foliar dañada de las plantas tratadas se muestran en la Figura 18 (Anexo).

El número de hojas producidas en promedio por planta por tratamiento varió de 40 a 44 (Figura 18). El tratamiento en el que las plantas produjeron un mayor número de hojas (44) fue el del 0 % de hojas inoculadas, mientras que en el tratamiento con el 100 % de hojas inoculadas se produjeron menos hojas (40). Sin embargo, entre los tratamientos no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $X^2 = 1.21$ ; gl = 4;  $P = >0.05$ ). La producción de flores en promedio por planta por tratamiento varió de 7 a 9 (Figura 18). En este caso, el tratamiento en el que las plantas produjeron un mayor número de flores (9) fue el del 100 % de hojas inoculadas y en el tratamiento con el 75 % de hojas inoculadas se produjo el menor número de flores (7). En este caso tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ( $X^2 = 1.96$ ; gl = 4;  $P = >0.05$ ). La producción de frutos en promedio por planta por tratamiento varió de 4 a 6 (Figura 18). El tratamiento en el cual las plantas produjeron un mayor número de frutos (6) fue en el del 50 % de hojas inoculadas y el tratamiento en el que se produjeron menos frutos (4) fue en el del 0 % de hojas inoculadas. Las diferencias entre tratamientos no fueron estadísticamente significativas ( $X^2 = 2.28$ ; gl = 4;  $P = >0.05$ ). El número de semillas producidas en promedio por fruto por planta por tratamiento varió de 275 a 326 (Figura 19). En este

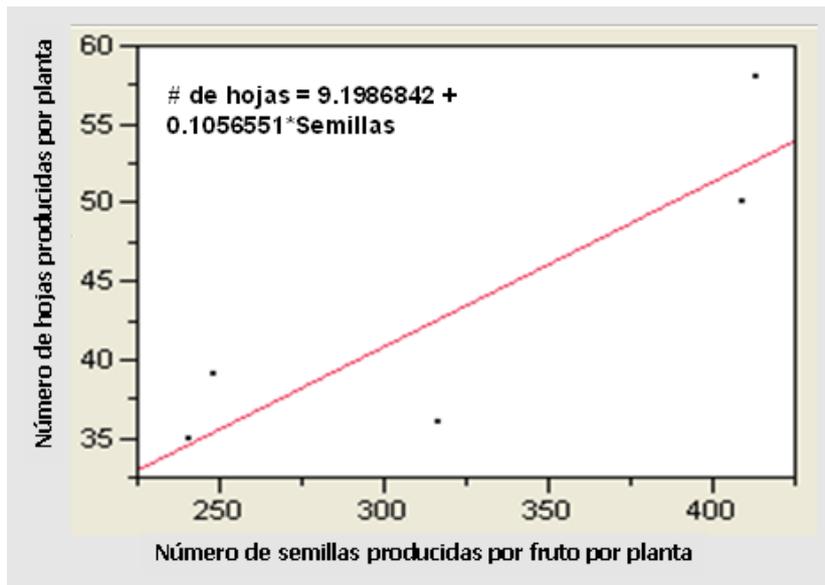
caso, el tratamiento en el que los frutos de las plantas que produjeron un mayor número de semillas (326) fue el del 0 % de hojas inoculadas, mientras que en el tratamiento con el 75 % de hojas inoculadas fue en el que se produjeron menos semillas por frutos por plantas (275). En este caso sí hubo diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ( $X^2 = 24.71$ ; gl = 4;  $P = <0.01$ ). La altura promedio de las plantas por tratamiento varió de 32 a 36 cm (Figura 18). El tratamiento en el que las plantas presentaron una altura mayor (36) fue en el del 75 % de hojas inoculadas y el tratamiento en donde las plantas presentaron una altura menor (32) fue en el del 25 % de hojas inoculadas. Las diferencias entre tratamientos no fueron estadísticamente significativas ( $X^2 = 1.54$ ; gl = 4;  $P = >0.05$ ). Finalmente, con respecto al diámetro promedio de las plantas por tratamiento varió de 1.3 a 1.4 cm (Figura 18). En el tratamiento en el que las plantas presentaron un diámetro mayor (1.4) fue en el del 75 % de hojas inoculadas, mientras que en el tratamiento del 25 % de hojas inoculadas fue en el que las plantas tuvieron un diámetro menor (1.3). En este caso, las diferencias entre tratamientos tampoco fueron diferencias estadísticamente significativas ( $X^2 = 0.01$ ; gl = 4;  $P = >0.05$ ).



**Figura 19. Número de semillas producidas en promedio por fruto por planta en cada uno de los tratamientos. Letras diferentes indican diferencias entre poblaciones.**

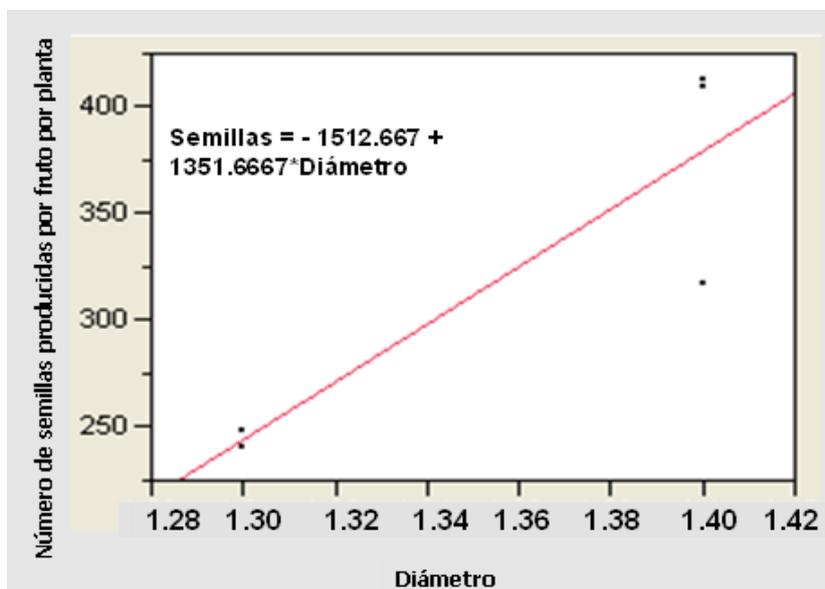
Aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre todos los tratamientos, cada uno de ellos tuvo valores particulares de los caracteres medidos. Por ejemplo, en el tratamiento con el 0 % de hojas inoculadas se observó, con respecto a los otros tratamientos, que las plantas produjeron el mayor número de hojas, un gran número de flores y, al contrario, el número más bajo de frutos aunque éstos presentaron el número más alto de semillas por fruto, mientras que la altura y el diámetro se mantuvieron en valores medios (Figuras 18 y 19). En el tratamiento con el 25 % de hojas inoculadas, las plantas produjeron un valor alto de hojas, un valor medio en el número de flores, uno bajo en el número de frutos y un valor medio en el número de semillas por fruto, y, la altura y el diámetro presentaron los valores más bajos (Figuras 18 y 19). En el caso del tratamiento con el 50 % de hojas inoculadas, se encontró que el número de hojas se mantuvo en un valor medio, el número de flores en un valor bajo, en cambio el número de frutos fue el más alto, aunque la producción de semillas por fruto fue baja y la altura se mantuvo en un valor alto mientras que el diámetro en un valor bajo (Figuras 18 y 19). Con respecto al tratamiento con el 75 % de hojas inoculadas, se observó que el número de hojas tuvo un valor bajo, la producción de flores fue la más baja, la producción de frutos se mantuvo en un valor medio mientras que la producción de semillas por fruto fue la más baja y la altura y el diámetro tuvieron los valores más altos (Figuras 18 y 19). Finalmente, el tratamiento con el 100 % de hojas inoculadas mostró la menor producción de hojas, el número más alto de flores, un número alto tanto en producción de frutos como en producción de semillas por fruto, una altura baja y un diámetro con valor alto (Figuras 18 y 19).

En el tratamiento con el 0 % de hojas inoculadas se encontraron tres correlaciones estadísticamente significativas (Tabla 6). La primera fue entre el número de hojas producidas con el número de semillas producidas por fruto ( $R^2 = 0.775$ ;  $P = 0.0488$ ). La relación entre el número de hojas producidas con el número de semillas producidas por fruto fue positiva, es decir que las plantas que produjeron más hojas durante el experimento también produjeron una mayor cantidad de semillas (Figura 20).



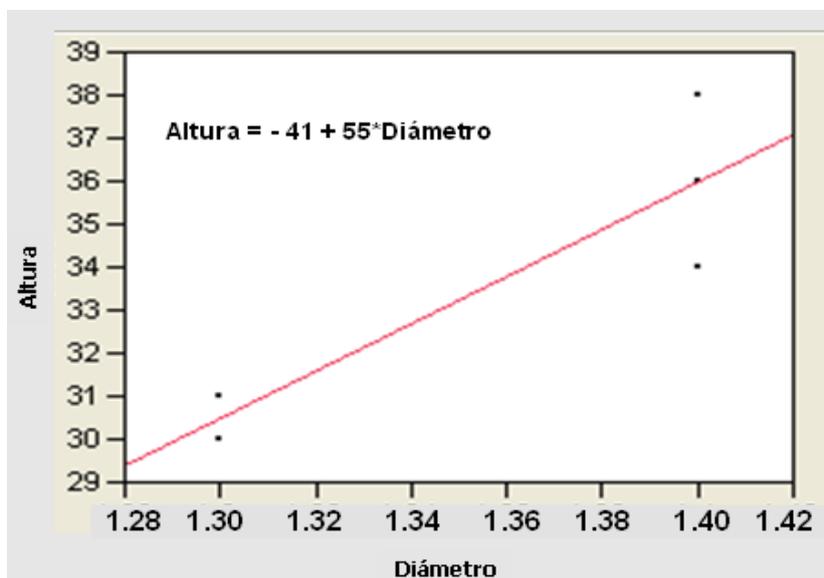
**Figura 20. Relación entre el número de hojas producidas y número de semillas producidas por fruto ( $R^2 = 0.775$ ;  $P = 0.0488$ ).**

La segunda correlación fue entre el número de semillas producidas por fruto con el diámetro ( $R^2 = 0.787$ ;  $P = 0.0446$ ), la cual resultó positiva, en este caso las plantas que produjeron más semillas fueron las que presentaron un diámetro mayor (Figura 21).



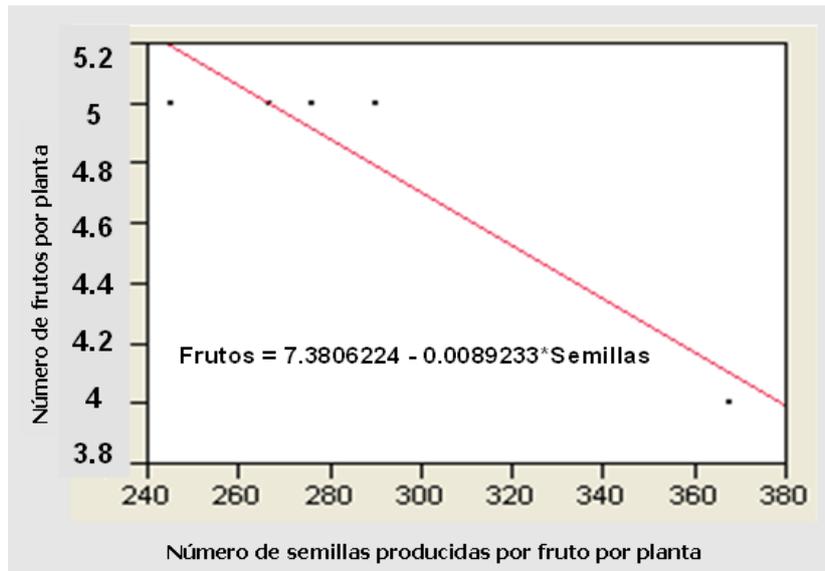
**Figura 21. Relación entre el número de semillas producidas por fruto y el diámetro ( $R^2 = 0.787$ ;  $P = 0.0446$ ).**

La tercera correlación fue entre la altura y el diámetro ( $R^2 = 0.810$ ;  $P = 0.0373$ ), la cual también resultó positiva, es decir que las plantas con mayor altura también eran las del diámetro mayor (Figura 22).



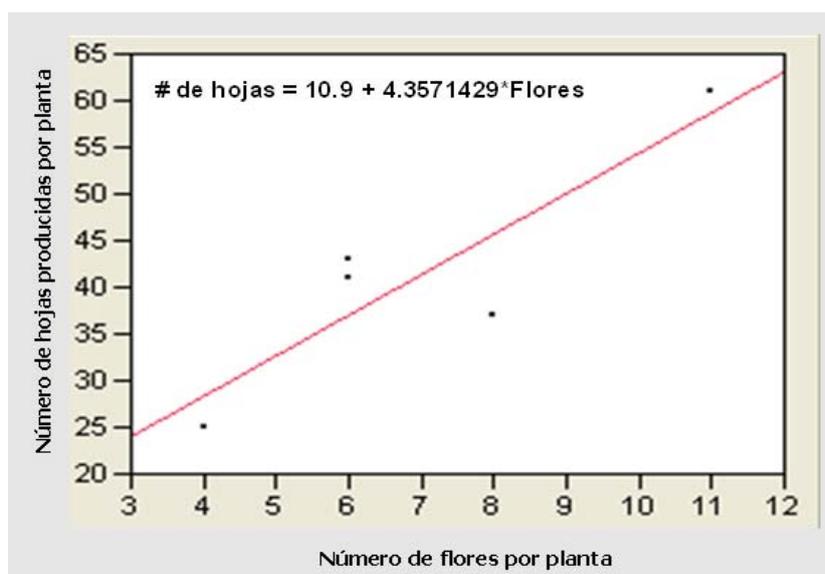
**Figura 22. Relación entre la altura y el diámetro ( $R^2 = 0.810$ ;  $P = 0.0373$ ).**

En el tratamiento con el 25 % de hojas inoculadas con la suspensión de micelio-esporas, sólo se encontró una correlación estadísticamente significativa (Tabla 7), la cual fue entre el número de frutos con el número de semillas producidas por fruto ( $R^2 = 0.879$ ;  $P = 0.0186$ ). Esta correlación fue negativa, en las plantas que produjeron más frutos la cantidad de semillas fue menor (Figura 23).

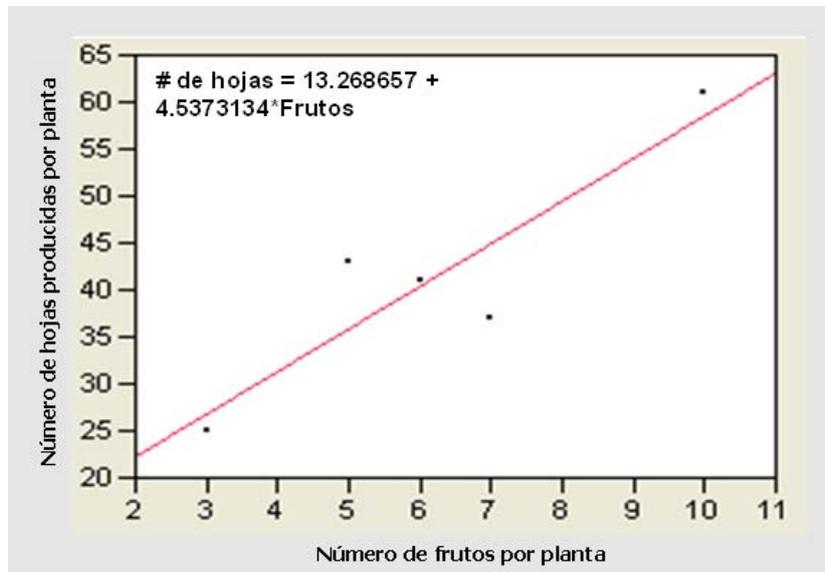


**Figura 23. Relación entre el número de frutos y el número de semillas producidas por fruto ( $R^2 = 0.879$ ;  $P = 0.0186$ ).**

Con respecto al tratamiento con el 50 % de hojas inoculadas con la suspensión de micelio-esporas se encontraron cinco correlaciones estadísticamente significativas (Tabla 8), la primera y la segunda fue entre el número de hojas producidas con el número flores ( $R^2 = 0.787$ ;  $P = 0.0446$ ) (Figura 24) y con el número de frutos ( $R^2 = 0.817$ ;  $P = 0.0352$ ) (Figura 25). Ambas resultaron positivas, las plantas que produjeron un mayor número de hojas también produjeron un mayor número de flores y de frutos (Figuras 24 y 25).

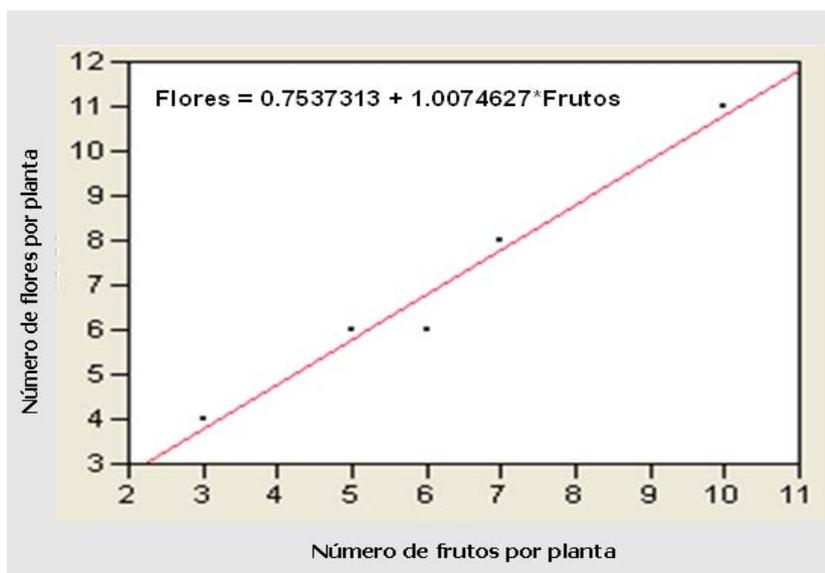


**Figura 24. Relación entre el número de hojas producidas y el número de flores ( $R^2 = 0.787$ ;  $P = 0.0446$ ).**



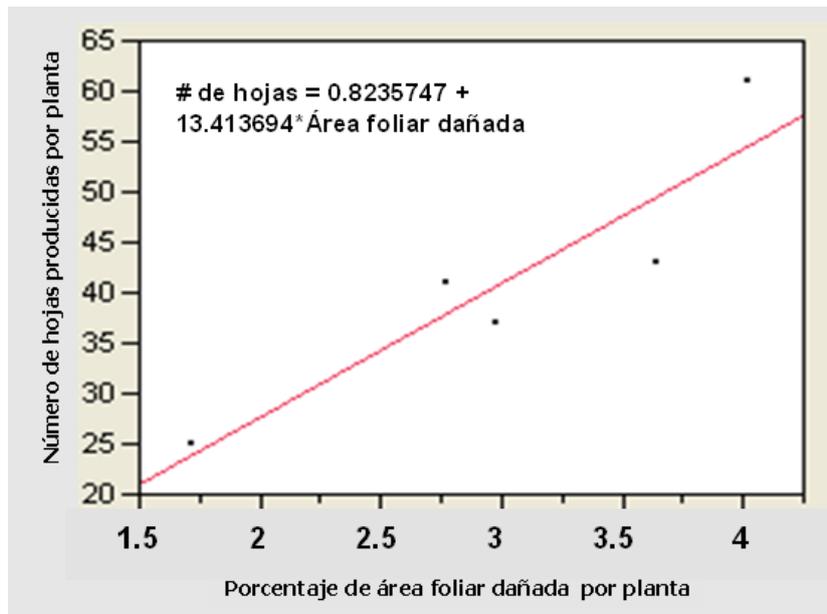
**Figura 25. Relación entre el número de hojas producidas y el número de frutos ( $R^2 = 0.817$ ;  $P = 0.0352$ ).**

La tercera correlación fue entre el número de flores con el número frutos ( $R^2 = 0.972$ ;  $P = 0.0021$ ), ésta resultó positiva, las plantas que produjeron más flores también produjeron más frutos (Figura 26).

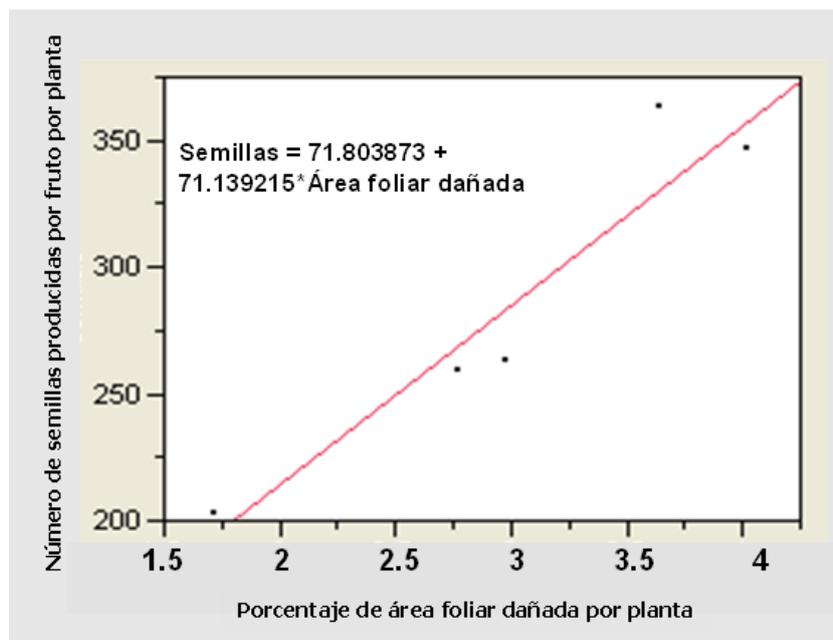


**Figura 26. Relación entre el número de flores y el número de frutos ( $R^2 = 0.972$ ;  $P = 0.0021$ ).**

La cuarta y la quinta correlación fue entre el área foliar dañada con el número de hojas producidas ( $R^2 = 0.843$ ;  $P = 0.0278$ ) (Figura 27) y con el número de semillas producidas por fruto ( $R^2 = 0.900$ ;  $P = 0.0139$ ) (Figura 28). Ambas resultaron positivas, las plantas que tuvieron un mayor porcentaje de área foliar dañada produjeron más hojas y más semillas por fruto (Figuras 27 y 28).



**Figura 27. Relación entre el porcentaje de área foliar dañada y el número de hojas producidas ( $R^2 = 0.843$ ;  $P = 0.0278$ ).**



**Figura 28. Relación entre el porcentaje de área foliar dañada y el número de semillas producidas por fruto ( $R^2 = 0.900$ ;  $P = 0.0139$ ).**

En cuatro de las correlaciones se observa que tres de los individuos se mantienen en valores intermedios y los otros dos individuos se localizaron en los valores máximo y mínimo respectivamente (Figuras 24 a 27). En la quinta correlación se observa que uno de los individuos se mantuvo en el valor más bajo, otros dos se localizaron en valores medios y los otros dos en los valores más altos (Figura 28).

En los tratamientos con el 75% y 100% de hojas inoculadas con la suspensión de micelio-esporas no se encontró ninguna correlación estadísticamente significativa (Tablas 9 y 10).

## **8. Discusión**

### **8.1. Niveles de daño foliar causado por hongos patógenos a *D. stramonium***

En este trabajo se encontraron variaciones en los niveles de daño causado por hongos tanto en el porcentaje de hojas dañadas como en el porcentaje de área foliar dañada. En algunos casos, el primero fue menor que el segundo. Es decir que aunque entre las poblaciones se presentaron pocas hojas dañadas (de 4.48 a 0.15 %), el porcentaje de daño en cada hoja tuvo un valor más alto (de 7.81 a 0.13 %), lo cual nos indica que las poblaciones de *Datura stramonium* presentan diferencias en la incidencia de enfermedades causadas por hongos. Estas diferencias pueden estar influenciadas por los factores ambientales particulares de cada población así como por la presencia de otros organismos dentro de la misma planta, por ejemplo, insectos herbívoros y hongos patógenos o endófitos, y por las características de la planta, por ejemplo, tamaño de los individuos y sus vecinos, diferencias en la dureza, la forma, la presencia de estructuras defensivas, así como el grado de sombra de cada hoja, la nutrición mineral de las plantas y la edad ontogénica de las diferentes partes de la planta (Burdon, 1987; 1993; Lenné *et al.*, 1994; Shaw y Peters, 1994, Scheffer, 1997). Además se mostró que los hongos tienen un papel importante como enemigos naturales de *D. stramonium* ya que causan un daño significativo en las hojas.

## **8.2. Relación de los factores ambientales con los niveles de daño foliar de *D. stramonium***

Este estudio mostró que existen diferencias en los niveles de precipitación y temperatura media anual así como en el porcentaje de hojas dañadas y de área foliar dañada tanto por insectos herbívoros como por hongos entre las poblaciones muestreadas. De acuerdo a los resultados, el porcentaje de área foliar dañada por hongos fue afectado por la precipitación media anual a nivel poblacional. Uno de los factores ambientales que se reporta dentro de los más importantes por su influencia en las enfermedades fúngicas es la humedad (Burdon, 1987; Campbell y Madden, 1990; Paul, 1990; Harrison *et al.*, 1994). Esto se debe a que la humedad favorece la formación y germinación de esporas, la supervivencia de los hongos así como los procesos de infección (Burdon, 1987; Harrison *et al.*, 1994; Gould, 2008). Por lo tanto, al haber mayor precipitación media anual en ciertas poblaciones de *D. stramonium*, es más probable que los hongos formen esporas y una vez formadas éstas puedan sobrevivir e infectar más hojas de plantas hospederas disponibles. Por ejemplo, en un experimento realizado con 18 especies de tréboles para evaluar el efecto de las características de las hojas que afectan la humedad foliar y la susceptibilidad a la infección por el hongo *Stemphylium* sp., se encontró que la duración del tiempo en el que el agua es retenida sobre la superficie de las hojas es un buen indicador de las tasas de infección después de la inoculación. Los tréboles que retienen el agua por más tiempo presentaron una gran proporción de hojas infectadas. Además, mientras mayor sea el tiempo de permanencia del agua sobre la superficie de la hoja, la probabilidad de que una espora llegue a germinar y sea capaz de infectar a la planta hospedera se incrementa. Aquí se demostró que la presencia de agua es crítica para la germinación de las esporas, por lo que periodos cortos de sequía reducen en gran medida las tasas de germinación (Bradley *et al.*, 2003).

Sin embargo, para analizar los agentes que están influyendo en el desarrollo de las enfermedades de las plantas es necesario considerar no solo a las características ambientales, sino también a los factores bióticos; algunos de éstos son, el tamaño de los individuos y la presencia de otros organismos patógenos o no (Burdon, 1987). Por ejemplo, en un estudio realizado con el hongo *Itersonilia perplexans*, patógeno de la planta *Arctium lappa* L., se evaluó el efecto de la densidad de inóculo, la edad de la hoja, la temperatura y la duración de la humedad en la hoja de la planta con el

desarrollo de la enfermedad fúngica. Se encontró una relación positiva entre la densidad del inóculo y la incidencia de la enfermedad. La edad de la hoja no presentó una relación estadísticamente significativa, pero se encontró que en las hojas se incrementa la resistencia al hongo con la edad. Con respecto a la temperatura, se encontró que la enfermedad ocurre a temperaturas de 10, 15 y 20 °C, y que el desarrollo de la enfermedad se incrementa a los 20 °C. Finalmente, la duración de los niveles de humedad también es importante ya que altos niveles de humedad facilitan que la infección sea alta. Además se encontró que la humedad relativa incrementa la producción de esporas sobre tejidos infectados (Horita *et al.*, 2005).

En el presente trabajo, la presencia de insectos herbívoros influyó positivamente haciendo que las hojas que presentaban niveles muy altos de herbivoría también mostraran niveles altos de área foliar dañada por hongos, esto sugiere que los herbívoros de *D. stramonium* podrían estar actuando como vectores de los hongos que la atacan o reduciendo las defensas de la planta, lo que la hace más susceptible a las enfermedades (Agrios, 2008). Además, las pruebas de patogenicidad apoyaron esta observación ya que se utilizó el tratamiento por herida para facilitar la infección por los tres géneros de hongos. Por ejemplo, en el estudio realizado con la planta *Cirsium arvense* se observó que los herbívoros *Cassida rubiginosa*, *Uroleucon cirsii* y *Aphis fabae* ssp. *cirsiiacanthoidis* son vectores del hongo *Puccinia punctiformis* (Kluth *et al.*, 2002). Aunque los hongos también podrían estar produciendo sustancias químicas que hagan más atractivas las hojas de *D. stramonium* para los insectos herbívoros. Por ejemplo en un estudio realizado con plantas de *Arachis hypogaea* se encontró que las hojas infectadas con el hongo *Sclerotium rolfsii* son preferidas por el herbívoro *Spodoptera exigua* (Cardoza *et al.*, 2002).

### **8.3. Identificación de los hongos patógenos que atacan a *D. stramonium***

En todas las poblaciones solo se identificaron tres hongos patógenos. Dos se encontraron en las diez poblaciones (*Alternaria* sp. y *Phoma* sp.) y solo uno se encontró en ocho de las poblaciones (*Epicoccum* sp.). Como se mencionó anteriormente, es común encontrar que una sola especie de planta hospedera esté infectada por varias especies de patógenos (Burdon, 1987; Shaw y Peters, 1994). En este trabajo, *Epicoccum* no se encontró en las poblaciones de Xochipala y Rancho de

Colores en Guerrero. Estas dos poblaciones son las que presentaron una mayor temperatura media anual en comparación con las otras poblaciones donde se colectaron las hojas de la planta, por lo que es posible que la incidencia de *Epicoccum* sp. se vea afectada por este factor. Al cultivar los hongos en medio PDA, *Epicoccum* sp. tardó más en crecer que *Alternaria* sp. y *Phoma* sp. y cuando se pusieron en una incubadora a 27 °C *Epicoccum* sp. no creció hasta que se dejaron las cajas de Petri a temperatura ambiente. Es interesante observar que *D. stramonium* es una maleza que también comparte la característica de ser atacada por pocas especies de hongos patógenos y que, además, dentro de las especies del género *Epicoccum* la mayoría son saprobios y no se reporta que sean parásitos. Monteiro *et al.*, (2003) aislaron dos hongos: *Curvularia lunata* y *Phyllachora* sp., de la maleza *Hymenachne amplexicaulis*. Se ha demostrado que *C. lunata* tiene un rango limitado de hospederos mientras que *Phyllachora* sp., es biótrofo y raramente es parásito.

#### **8.4. Efectos de *Alternaria* sp. en el desempeño y en el éxito reproductivo en plantas de *D. stramonium***

Dentro de cada población las plantas muestreadas presentaron diferencias tanto en la altura como en el número de frutos. En las poblaciones naturales de *D. stramonium* se encontró, a nivel de individuo por población, que los factores relacionados negativamente con el porcentaje de hojas dañadas por hongos fueron la altura y el número de frutos. El porcentaje de área foliar dañada por patógenos se relacionó positivamente con la altura de la planta. Otros estudios en sistemas naturales han reportado que las enfermedades causadas por hongos foliares pueden reducir el desempeño y el éxito reproductivo de las plantas (Burdon, 1987; Manners, 1993; Gilbert, 2002; Shaw, 2006). Sin embargo para que se observe un efecto significativo de las enfermedades foliares en el éxito reproductivo y el desempeño de las plantas, el área foliar atacada por los hongos debe ser muy alta. Por ejemplo en el estudio realizado con el hongo *Melampsora lini* y su planta hospedera *Linum marginale* para conocer cómo era la interacción hospedero-patógeno, se encontró que el principal efecto de la enfermedad es reducir la sobrevivencia de las plantas hospederas. Sin embargo, el efecto dependió de los niveles de enfermedad, ya que las plantas que fueron más fuertemente atacadas tuvieron una mayor reducción en la sobrevivencia que las plantas ligeramente infectadas. En este estudio se observó que el momento en

el que ocurre la enfermedad, la severidad y los niveles de la enfermedad determinaron el efecto de la infección de *M. lini* sobre *L. marginale* (Jarosz y Burdon, 1992).

En el presente trabajo, debido a los resultados en el campo y a las correlaciones entre factores ambientales y parámetros biológicos medidos, fue necesario hacer experimentos para determinar si los hongos tienen un efecto sobre el desempeño y el éxito reproductivo de *Datura stramonium*. Por lo tanto, se realizó un experimento en el invernadero, el cual mostró que en condiciones experimentales el porcentaje de área foliar dañada promedio de las plantas infectadas con *Alternaria* sp., fue menor que el observado en el campo ( $4.5 \% \pm 2.8$ ). También se observó que las plantas produjeron menos ramas, hojas y frutos, y su altura fue menor a las plantas que crecen de manera silvestre. Estos resultados podrían deberse a que las condiciones ambientales que prevalecen en el invernadero no son las más adecuadas para el desarrollo de las plantas y del hongo, ya que la humedad relativa en el invernadero no presenta las fluctuaciones que se presentan de manera natural en el campo; y la humedad es importante en los procesos de infección (Bradley *et al.*, 2003).

Aunque *Alternaria* sp. produce lesiones foliares discretas que individualmente podrían tener efectos pocos notables sobre las plantas hospederas (Burdon, 1993), los resultados de este trabajo mostraron que este hongo causa una reducción tanto en el éxito reproductivo como el desempeño de *D. stramonium*. Las plantas sanas produjeron más semillas por fruto, tuvieron un mayor número de hojas y tallos de mayor diámetro que las inoculadas con el hongo. Además, las plantas con mayor diámetro también fueron las de mayor altura. Es decir, que las plantas sanas tuvieron un mejor desempeño y éxito reproductivo en comparación con las plantas inoculadas con la suspensión de micelio-esporas. Estos resultados concuerdan con lo descrito en otros trabajos que indican que los hongos foliares reducen el éxito reproductivo y el desempeño de sus plantas hospederas (Burdon, 1987; Boyette y Turfitt, 1988; Manners, 1993; Jarosz y Davelos, 1995; Gilbert, 2002; Shaw, 2006).

Los efectos de *Alternaria* sp. sobre las plantas de *D. stramonium* dependieron del porcentaje de área foliar dañada. Por ejemplo, las plantas que tuvieron una mayor área foliar dañada produjeron un mayor número de hojas y de semillas. Sin embargo, aunque se encontró una correlación positiva entre los niveles de daño foliar con la producción de hojas y de semillas, se observó que las plantas sanas tuvieron un mejor

desempeño y éxito reproductivo que las plantas inoculadas con *Alternaria* sp. Se ha reportado que los patógenos, al infectar las hojas, pueden afectar tanto la cantidad como la calidad de las semillas producidas debido a que causan una reducción o un cambio en la distribución de la energía dentro de las plantas infectadas (Burdon, 1987). Por lo tanto, en este caso la infección estaría influyendo en la cantidad de semillas y de hojas. Asimismo, es posible que las plantas de *D. stramonium* sean resistentes a la infección causada por *Alternaria* sp. y que se necesite un experimento por un periodo más largo para conocer los efectos acumulativos de la enfermedad causada por este hongo patógeno foliar sobre las plantas hospederas. Por ejemplo, en un experimento de 5 años con la roya *Triphragmium ulmariae* para conocer el daño que causa sobre las plántulas de *Filipendula ulmaria*, se encontró que el patógeno tiene un efecto importante en la sobrevivencia de las plántulas. Durante el primer año no se registraron muertes de las plantas hospederas, posteriormente se registró un 89 % de muertes. Además se observó que el 11 % de las plántulas que sobrevivieron durante el periodo de estudio mostraron bajos niveles de severidad de la enfermedad, lo que indica que estas plantas eran resistentes a la enfermedad (Ericson *et al.*, 2002). En otro estudio realizado con el hongo *Alternaria brassicicola* para ver los efectos de la enfermedad sobre el éxito reproductivo de las plantas *Cakile maritima* y *Cakile edentula*, se observó que la enfermedad fue más severa en *C. maritima* que en *C. edentula*. También se encontró que la severidad de la enfermedad incrementa con el tiempo. La enfermedad redujo el crecimiento, ya que se observó que las plántulas inoculadas a una edad temprana fueron más pequeñas. Además, también redujo el éxito reproductivo de las plantas debido a que las plantas produjeron menos vainas y éstas tuvieron menos peso que las de las plantas testigo. Finalmente, en este estudio se demostró que no sólo la severidad sino también el momento en el cual ocurre la enfermedad así como la duración de la misma son factores importantes a considerar para conocer las consecuencias en el éxito reproductivo de las plantas en condiciones naturales (Bock, 2008). Tanto en esta investigación como en el presente trabajo, se encontró que las plantas sanas tuvieron un mejor desempeño y éxito reproductivo que las plantas inoculadas con *Alternaria* sp. De manera general, encontramos que la infección con *Alternaria* sp., causa la reducción en el éxito reproductivo y en menor grado en el desempeño de las plantas hospederas.

## 9. Conclusiones

En el presente trabajo se encontró variación en la incidencia de enfermedades causadas por hongos en las 10 poblaciones de *Datura stramonium*.

Se determinó que existen diferentes especies de hongos que atacan a las poblaciones de estudio. *Alternaria* sp., *Epicoccum* sp. y *Phoma* sp. se identificaron como los hongos patógenos que atacan el follaje de *D. stramonium*. Aún es necesario concluir la identificación a nivel de especie de estos hongos.

La variación en la incidencia de enfermedades en *D. stramonium* se vio afectada tanto por factores abióticos (precipitación media anual) como por factores bióticos (la presencia de insectos herbívoros).

Finalmente, los experimentos en invernadero con *Alternaria* sp., mostraron que éste causa la reducción en el éxito reproductivo y en menor grado en el desempeño de las plantas hospederas de *D. stramonium*. Aunque los efectos fueron poco notables.

## 10. Literatura citada

- Agrios, G. N. 1997. *Plant Pathology*. Academic Press. San Diego, California, EEUU 635 pp.
- Agrios, G. N. 2008. Transmission of plant diseases by insects. Pp. 3853-3885. In: Capinera, J. L. (ed.). *Encyclopedia of entomology*. Springer Science + Business Media B. V. Leipzig, Alemania.
- Alexander, H. M. 2010. Disease in natural plant populations, communities, and ecosystems: insights into ecological and evolutionary processes. *Plant Disease*, **94** (5): 492-503.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. Shaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller y T. J. Lippman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, **25**: 3389-3402.
- Arnold, A. E., L. C. Mejía, D. Kylo, E. I. Rojas, Z. Maynard, N. Robbins y E. A. Herre. 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *PNAS*, **100** (26): 15649-15654.
- Ayala-Zermeño, M. A. 2006. Caracterización fenotípica del hongo *Lecanicillium lecanii* (Zimmerman) Zare & W Gams (syn. *Verticillium lecanii* (Zimmerman) Viégas) para la selección de los aislados idóneos en el control biológico de la mosquita blanca (Homoptera: Aleyrodidae). Tesis de Maestría. Facultad de Medicina. UNAM. México. D. F. 57 pp.

- Barnett, H. L. y B. B. Hunter. 1972. *Illustrated genera of imperfect fungi*. Burgess Publishing Company. EE. UU. 241 pp.
- Bell, T., R. P. Freckleton y O. T. Lewis. 2006. Plant pathogens drive density-dependent seedling mortality in a tropical tree. *Ecology Letters*, **9**: 569-574.
- Blandino, M., A. Reyneri y F. Vanara. 2008. Effect of plant density on toxigenic fungal infection and mycotoxin contamination of maize kernels. *Field Crops Research*, **106**: 234-241.
- Bock, C. H. 2008. The effect of *Alternaria brassicicola* infection on the reproductive fitness of the naturally occurring littoral ruderals *Cakile maritime* and *C. edentula*. *Australasian Plant Pathology*, **37**: 569-580.
- Bowen, K. L. 2008. Plant disease epidemiology. Pp. 371-386. In: Trigiano, R. N., M. T. Windham y A. S. Windham (eds.). *Plant pathology: concepts and Laboratory Exercises*. CRC Press. Nueva York, EE. UU.
- Boyette, C. D. 1986. Evaluation of *Alternaria crassa* for biological control of Jimsonweed: host range and virulence. *Plant Science*, **45**: 223-228.
- Boyette, C. D. y L. B. Turfitt. 1988. Factors influencing biocontrol of Jimsonweed (*Datura stramonium* L.) with the leaf-spotting fungus *Alternaria crassa*. *Plant Science*, **56**: 261-264.
- Boyette, C. D., G. J. Weidemann, D. O. Te Beest y P. C. Quimby. 1991. Biological control of Jimsonweed (*Datura stramonium*) with *Alternaria crassa*. *Weed Science*, **39** (4): 678-681.
- Bradley, D. J., G. S. Gilbert y I. M. Parker. 2003. Susceptibility of clover species to fungal infection: the interaction of leaf surface traits and environment. *American Journal of Botany*, **90** (6): 857-864.
- Burdon, J.J. 1987. *Diseases and plant population biology*. Cambridge University Press. Londres, Inglaterra. 208 pp.
- Burdon, J. J. 1993. The structure of pathogen populations in natural plant communities. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **31**: 305-323.
- Burdon, J. J. 1997. The evolution of gene for gene interactions in natural pathosystems. Pp. 245-262. In: Crute, I. R., E. B. Holub y J. J. Burdon (eds.). *The gene-for-gene relationship in plant-parasite interactions*. CAB International. Londres, Inglaterra.
- Burdon, J. J., A. H. D. Brown y A. M. Jarosz. 1990. The spatial scale of genetic interactions in host-pathogen coevolved systems. Pp. 233-247. In: Burdon, J. J. y S. R. Leather (eds.). *Pests, pathogens and plant communities*. Blackwell Scientific Publications. Londres, Inglaterra.
- Campbell, C. L. y L. V. Madden. 1990. *Introduction to plant disease epidemiology*. John Wiley & Sons. EE. UU. 532 pp.
- Cardoza, Y. J., H. T. Alborn y J. H. Tumlinson. 2002. In vivo volatile emissions from peanut plants induced by simultaneous fungal infection and insect damage. *Journal of Chemical Ecology*, **28** (1): 161-174.
- Carlile, M. J., S. C. Watkinson y G. W. Gooday. 2001. *The fungi*. Elsevier Academic Press. Gran Bretaña. 588 pp.
- Christ, B. J., C. O. Person y D. D. Pope. 1987. The genetic determination of variation in pathogenicity. Pp. 7-19. In: Wolfe, M. S. y C. E. Caten (eds.). *Populations of plant pathogens: their dynamics and genetics*. Blackwell Scientific Publications. Londres, Inglaterra.
- Dimond, A. E. 1975. Patogénesis y predisposición. Pp. 21-118. In: A. A. Sarasola, y M. A. R. de Sarasola (eds.). *Fitopatología. Curso moderno. Tomo I. Fitopatología general-control*, Editorial Hemisferio Sur. Argentina. 364pp.
- Dix, N. J. y J. Webster. 1995. *Fungal Ecology*. Chapman & Hall. Londres, Inglaterra. 549 pp.

- Ericson, L., J. J. Burdon y W. J. Müller. 2002. The rust pathogen *Triphragmium ulmariae* as a selective force affecting its host, *Filipendula ulmaria*. *Journal of Ecology*, **90**: 167-178.
- Espinosa-García, F. J. 2001. La diversidad de los metabolitos secundarios y la teoría de la defensa vegetal. Pp. 231-249. In: A. L., Anaya, F. J. Espinosa-García y R. Cruz-Ortega (eds.). *Relaciones químicas entre organismos: aspectos básicos y perspectivas de su aplicación*. Plaza y Valdés. México, D. F.
- Flor, H. H. 1942. Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. *Phytopathology*, **32** (8): 653-669.
- Flor, H. H. 1955. Host-parasite interaction in flax rust-its genetics and other implications. *Phytopathology*, **45**: 680-685.
- Fornoni, J., P. L. Valverde y J. Núñez-Farfán. 2004. Population variation in the cost and benefit of tolerance and resistance against herbivory in *Datura stramonium*. *Evolution*, **58** (8): 1696-1704.
- Fournier, V., J. A. Rosenheim, J. Brodeur, J. M. Diez y M. W. Johnson. 2006. Multiple plant exploiters on a shared host: testing for nonadditive effects on plant performance. *Ecological Applications*, **16** (6): 2382-2398.
- Fujita, M., Y. Fujita, Y. Noutoshi, F. Takahashi<sup>1</sup>, Y. Narusaka, K. Yamaguchi-Shinozaki y K. Shinozaki. 2006. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Curr. Opin. Plant. Biol.*, **9**: 436-442.
- García, E. 1989. *Apuntes de climatología*. Instituto de Geografía, UNAM. México, D.F. 97 pp.
- García-Guzmán, M. G. 1986. Evaluación y control de los problemas fitopatológicos en durazno (*Prunus persica* [L.] Bastch) durante el almacenamiento en cadenas comerciales del área metropolitana. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México. D. F. 152 pp.
- García-Guzmán, M. G. 1990. Estudio sobre ecología de patógenos en el follaje de plantas en la selva de los Tuxtlas. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias. UNAM. México. D. F. 149 pp.
- García-Guzmán, G. y J. Benítez-Malvido. 2003. Effect of litter on the incidence of leaf-fungal pathogens and herbivory in seedlings of the tropical tree *Nectandra ambigens*. *Journal of Tropical Ecology*, **19**: 171-177.
- García-Guzmán, G. y A. Wennström. 2001. Interactions between two rust fungi and their host plant *Anemone nemorosa*. *Ecography*, **24**: 25-32.
- García-Guzmán, G., J. J. Burdon, J. E. Ash y R. B. Cunningham. 1996. Regional and local patterns in the spatial distribution of the flower-infecting smut fungus *Sporisorium amphiphilophis* in natural populations of its host *Bothriochloa macra*. *New Phytologist*, **132**: 459-469.
- Gilbert, G. S. 2002. Evolutionary ecology of plant diseases in natural ecosystems. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **40**: 13-43.
- Gilbert, G. S. y C. O. Webb. 2007. Phylogenetic signal in plant pathogen – host range. *PNAS*, **104**: 4979-4983.
- Gould, A. B. 2008. Plant pathogenic fungi. Pp. 85-100. In: Trigiano, R. N., M. T. Windham y A. S. Windham (eds.). *Plant pathology: concepts and Laboratory Exercises*. CRC Press. Nueva York, EE. UU.
- Harrison, J. G., R. Lowe y N. A. Williams. 1994. Humidity and fungal diseases of plants-problems. Pp. 79-97. In: Blakeman, J.P. y B. Williamson (eds.). *Ecology of plant pathogens*. Cab. International. Oxon, Inglaterra.
- Hibbett, D. S., M. Binder, J. F. Bischoff, M. Blackwell, P. F. Cannon, O. E. Eriksson, S. Huhndorf, T. James, P. M. Kirk, R. Lücking, H. Thorsten Lumbsch, F. Lutzoni, P. B. Matheny, D. J. McLaughlin, M. J. Powell, S. Redhead, C. L. Schoch, J. W.

- Spatafora, J. A. Stalpers, R. Vilgalys, M. C. Aime, A. Aptroot, R. Bauer, D. Begerow, G. L. Benny, L. A. Castlebury, P. W. Crous, Y. C. Dai, W. Gams, D. M. Geiser, G. W. Griffith, C. Gueidan, D. L. Hawksworth, G. Hestmark, K. Hosaka, R. A. Humber, K. D. Hyde, J. E. Ironside, U. Koljalg, C. P. Kurtzman, K. H. Larsson, R. Lichtwardt, J. Longcore, J. Miadlikowska, A. Miller, J. M. Moncalvo, S. Mozley-Standridge, F. Oberwinkler, E. Parmasto, V. Reeb, J. D. Rogers, C. Roux, L. Ryvarden, J. P. Sampaio, A. Schüßler, J. Sugiyama, R. G. Thorn, L. Tibell, W. A. Untereiner, C. Walker, Z. Wang, A. Weir, M. Weiss, M. M. White, K. Winka, Y. J. Yao y N. Zhang. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the *Fungi*. *Mycological Research*, **111**: 509-547.
- Hoagland, R. E. y C. D. Boyette. 1994. Pathogenic interactions of *Alternaria crassa* and phenolic metabolism in Jimsonweed (*Datura stramonium* L.) varieties. *Weed Science*, **42**: 44-49.
- Holliday, P. 1992. *A dictionary of plant pathology*. Cambridge University Press. Nueva York, EE. UU. 369 pp.
- Horita, H., R. J. McGovern, T. Komatsu y S. Yasuoka. 2005. Effects of inoculum density, leaf age, moisture, temperature, and wetness duration on black streak of edible burdock. *J Gen Plant Pathol*, **71** (4): 247-252.
- Inbar, M., H. Doostdar, R. M. Sonoda, G. L. Leibe y R. T. Mayer. 1998. Elicitors of plant defensive systems reduce insect densities and disease incidence. *Journal of Chemical Ecology*, **24** (1): 135-149.
- Jarosz, A. M. y J. J. Burdon. 1992. Host-pathogen interactions in natural populations of *Linum marginale* and *Melampsora lini*. *Oecologia*, **89** (1): 53-61.
- Jarosz, A. M. y A. L. Davelos. 1995. Transley review no. 81. Effects of disease in wild plant populations and the evolution of pathogen aggressiveness. *New Phytologist*, **129** (3): 371-387.
- Kang S., M. A. Mansfield, B. Park, D. M. Geiser, K. L. Ivors, M. D. Coffey, N. J. Grünwald, F. N. Martin, C. André Lévesque y J. E. Blair. 2010. The promise and pitfalls of sequence-based identification of plant-pathogenic fungi and oomycetes. *Phytopathology*, **100** (8): 732-737.
- Kluth, S., A. Kruess y T. Tschardt. 2002. Insects as vectors of plant pathogens: mutualistic and antagonistic interactions. *Oecologia*, **133**: 193-199.
- Lenné, J. M. 2002. Non-infectious Disorders. Pp. 190-194. In: J. M., Waller, J. M. Lenné y S. J. Waller (eds.). *Plant pathologist's pocketbook*, CABI Publishing. Londres, Inglaterra.
- Lenné, J. M., D. M. Teverson y M. J. Jeger. 1994. Evaluation of plant pathogens in complex ecosystems. Pp. 63-77. In: Blakeman, J.P. y B. Williamson (eds.). *Ecology of plant pathogens*. Cab. International. Oxon, Inglaterra.
- Leonard, K. J. 1987. The host population as a selective factor. Pp. 163-179. In: Wolfe, M. S. y C. E. Caten (eds.). *Populations of plant pathogens: their dynamics and genetics*. Blackwell Scientific Publications. Londres, Inglaterra.
- Lindquist, J. C. 1975. Conceptos preliminares. Pp. 1-8. In: A. A. Sarasola, y M. A. R. de Sarasola (eds.). *Fitopatología. Curso moderno. Tomo I. Fitopatología general-control*, Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina.
- Manners, J. G. 1993. *Principles of plant pathology*. Cambridge University Press. Inglaterra. 343 pp.
- May, R. M. 1990. Population biology and population genetics of plant-pathogen associations. Pp. 309-325. In: Burdon, J. J. y S. R. Leather (eds.). *Pests, pathogens and plant communities*. Blackwell Scientific Publications. Londres, Inglaterra.
- McLaughlin, D. J., D. S. Hibbett, F. Lutzoni, J. W. Spatafora y R. Vilgalys. 2009. The search for the fungal tree of life. *Trends in Microbiology*, **17** (11): 488-497.

- Mier T., C. Toriello y M. Ulloa. 2002. *Hongos microscópicos, saprobios y patógenos: Métodos de Laboratorio*. UAM/UNAM. México, D.F. 90 pp.
- Monteiro, F. T., B. S. Vieira y R. W. Barreto. 2003. *Curvularia lunata* y *Phyllachora* sp.: two fungal pathogens of the grassy weed *Hymenachne amplexicaulis*. *Australian Plant Pathology*, **32**: 449-453.
- Moran, P. J. 1998. Plant-mediated interactions between insects and a fungal plant pathogen and the role of plant chemical responses to infection. *Oecologia*, **115**: 523:530
- Núñez-Farfán, J. S. 1991. Biología Evolutiva de *Datura stramonium* L. en el centro de México: selección natural de la resistencia a los herbívoros, sistema de cruzamiento y variación genética intra e interpoblacional. Tesis doctoral. Centro de Ecología-UACPyP/CCH. UNAM. México, D. F. 215pp.
- Núñez-Farfán, J. y R. Dirzo. 1994. Evolutionary ecology of *Datura stramonium* L. in Central Mexico: Natural selection for resistance to herbivorous insects. *Evolution*, **48** (2): 423-436.
- Paul, N. D. 1990. Modification of the effects of plant pathogens by other components of natural ecosystems. Pp. 81-96. In: Burdon, J. J. y S. R. Leather (eds.). *Pests, pathogens and plant communities*. Blackwell Scientific Publications. Londres, Inglaterra.
- Pirofski, L. A. y A. Casadevall. 2008. The Damage-Response Framework of Microbial Pathogenesis and Infectious Diseases. Pp. 135-146. In: Huffnagle, G. B. y M. C. Noverr (eds.). *GI Microbiota and Regulation of the Immune System*, Landes Bioscience and Springer Science+Business Media. Nueva York, EE. UU.
- Robert, C., M. O. Bancal, B. Ney y C. Lannou. 2004. Wheat leaf photosynthesis loss due to leaf rust, with respect to lesion development and leaf nitrogen status. *New Phytologist*, **165**: 227-241.
- Rostás, M., J. Ton, B. Mauch-Mani y T. C. J. Turlings. 2006. Fungal infection reduces herbivore-induced plant volatiles of maize but does not affect naïve parasitoids. *Journal of Chemical Ecology*, **32**: 1897-1909.
- Roy, B. A., S. Güsewell y J. Harte. 2004. Response of plant pathogens and herbivores to a warming experiment. *Ecology*, **89**: 2570-2581.
- Rzedowski, J. 1994. *Vegetación de México*. Editorial Limusa. México. 432 pp.
- Scheffer, R. P. 1997. *The nature of disease in plants*. Cambridge University Press. EE. UU. 325 pp.
- Shaw, M. W. 2006. Pathogen population dynamics. Pp. 193-214. In Cooke, B. M., D. Gare Jones y B. Kaye (eds.). *The epidemiology of plant diseases*. Springer. Dordrecht, Holanda.
- Shaw, M. W. y J. C. Peters. 1994. The biological environment and pathogen population dynamics: uncertainty, coexistence and competition. Pp. 17-37. In: Blakeman, J.P. y B. Williamson (eds.). *Ecology of plant pathogens*. Cab. International. Oxon, Inglaterra.
- Thompson, J. N. 1990. Coevolution and the evolutionary genetics of interactions among plants and insects and pathogens. Pp. 249-271. In: Burdon, J. J. y S. R. Leather (eds.). *Pests, pathogens and plant communities*. Blackwell Scientific Publications. Londres, Inglaterra.
- Thompson, J. N. 2005. *The geographic mosaic of coevolution*. The University of Chicago Press. EE.UU. 439 pp.
- Trevathan, L. E. 2004. Pathogen attack strategies. Pp. 235-246. In: Trigiano, R. N., M. T. Windham y A. S. Windham (eds.). *Plant pathology: concepts and Laboratory Exercises*. CRC Press. Nueva York, EE. UU.
- Ulloa, M. y R. T. Hanlin. 1978. *Atlas de micología básica*. Concepto. México, D. F. 158 pp.

- Valverde, P. L., J. Fornoni y J. Núñez-Farfán. 2001. Defensive role of leaf trichomes in resistance to herbivorous insects in *Datura stramonium*. *J. Evol. Biol.*, **14**: 424-432.
- Valverde, P. L., J. Fornoni y J. Núñez-Farfán. 2003. Evolutionary ecology of *Datura stramonium*: equal plant fitness benefits of growth and resistance against herbivory. *J. Evol. Biol.*, **16**: 127-137.
- Waller, J. M. y P. F. Cannon. 2002. Fungi as Plant Pathogens. Pp. 75-93. In: J. M., Waller, J. M. Lenné y S. J. Waller (eds.). *Plant pathologist's pocketbook*, CABI Publishing. Londres, Inglaterra. 516 pp.
- Waller, J. M. y J. M. Lenné. 2002. Disease Resistance. Pp. 328-335. In: J. M., Waller, J. M. Lenné y S. J. Waller (eds.). *Plant pathologist's pocketbook*, CABI Publishing. Londres, Inglaterra. 516 pp.
- Weaver, S. E. y S. I. Warwick. 1984. The biology of Canadian weeds. 64. *Datura stramonium* L. *Can. J. Plant Sci.*, **64**: 979-991.
- Webb, C. O., G. S. Gilbert y M. J. Donoghue. 2006. Phylodiversity – dependent seedling mortality size structure, and disease in a bornean rain forest. *Ecology*, **87**: S123-S131
- Windham, M. T. y A. S. Windham. 2008. What is a disease? Pp. 7-10. In: Trigiano, R. N., M. T. Windham y A. S. Windham (eds.). *Plant pathology: concepts and Laboratory Exercises*. CRC Press. Nueva York, EE. UU.
- Zar, J. H. 1984. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall. Nueva Jersey, EE. UU. 718 pp.

## 11. Anexo

**Tabla 1. Ubicación geográfica, altitud, precipitación media anual, temperatura media anual, tipos de vegetación y clima presente en las poblaciones de estudio.**

Sitio	Latitud (W)	Longitud (N)	Altitud (m.s.n.m.)	Precipitación media anual (mm)	Temperatura media anual (°C)	Tipo de Vegetación	Clima
Xochipala	-99,63	17,80	1097	710	23.7	BTC	Aw
Rancho de Colores	-99,60	18,52	1450	1192	22.6	BTC	Aw
San Agustín Tlaxiaca	-98,89	20,12	2359	507	14.8	MX	BS
Francisco Villa	-99,02	20,32	1951	460	16.5	MX	BS
Patria Nueva	-99,05	20,38	1916	460	16.6	MX	BS
Peña Dos	-99,18	20,45	1757	382	17.9	MX	BS
Magdalena de Tlaltelulco	-98,20	19,30	2307	852	15.2	BCQ	Cb
Panzacola	-98,23	19,15	2193	813	16.3	BCQ	Cb
Atlixco	-98,45	18,90	1856	885	19.4	MX	BS
Valsequillo	-98,14	18,95	2165	831	17.0	MX	BS

BTC (Bosque Tropical Caducifolio), MX (Matorral Xerófilo), BCQ (Bosque de coníferas y de *Quercus*) (Rzedowski, 1994). Aw (caliente subhúmedo con lluvias en verano), BS (seco estepario) y Cb (templado húmedo con verano fresco) (García, 1989).

**Tabla 2. Valores promedio por población de los factores ambientales: temperatura media anual, precipitación media anual, porcentaje de hojas dañadas por herbivoría, porcentaje de área foliar dañada por herbivoría, número de frutos y altura.**

<b>Sitio</b>	<b>Temperatura media anual (°C)</b>	<b>Precipitación media anual (mm)</b>	<b>Hojas dañadas por herbivoría (%)</b>	<b>± EE</b>	<b>Área foliar dañada por herbivoría (%)</b>	<b>± EE</b>	<b>Frutos</b>	<b>± EE</b>	<b>Altura (cm)</b>	<b>± EE</b>
Xochipala	23.7	710	97.42	11.5	1.96	7.4	5.55	3.7	42.53	11.2
Rancho de Colores	22.6	1192	99.19	5.1	5.71	8.5	10.70	7.9	81.73	17.3
San Agustín Tlaxiaca	14.8	507	87.61	18.8	5.38	8.6	2.70	2.8	29.78	19.6
Francisco Villa	16.5	460	97.96	5.8	2.81	6.6	4.95	3.4	39.60	16.1
Patria Nueva	16.6	460	99.40	3.3	1.30	5.5	4.10	5.0	43.90	20.3
Peña Dos	17.9	382	95.90	5.3	0.54	2.4	9.05	4.4	79.15	25.2
Magdalena de Tlaltelulco	15.2	852	98.61	4.5	3.90	8.4	6.18	11.0	56.58	32.2
Panzacola	16.3	813	97.84	8.3	4.58	13.0	3.13	2.9	59.28	19.9
Atlixco	19.4	885	96.82	12.9	1.63	3.3	7.75	8.8	51.68	18.8
Valsequillo	16.9	831	99.54	1.2	5.23	13.3	12.70	13.4	62.55	16.7

**Tabla 3. Valores de las X<sup>2</sup> obtenidas de la prueba de Wilcoxon/Kruskal-Wallis aplicadas para cada factor.**

Factor	X <sup>2</sup>	gl	P
<b>A</b>	<b>166.10</b>	<b>9</b>	<b>&lt;0.0001*</b>
<b>F</b>	<b>75.10</b>	<b>9</b>	<b>&lt;0.0001*</b>
<b>Hdh</b>	<b>72.00</b>	<b>9</b>	<b>&lt;0.0001*</b>
<b>Afdh</b>	<b>21.80</b>	<b>9</b>	<b>0.0095*</b>

Altura (A), número de frutos (F), porcentaje de hojas dañadas por herbivoría (Hdh) y porcentaje de área foliar dañada por herbivoría (Afdh).

**Tabla 4. Correlaciones por sitio entre los factores bióticos y abióticos con los niveles de daño foliar causado por hongos.**

Correlación	R <sup>2</sup>	P
Hd x T	0.057	0.507
Hd x P	0.010	0.788
Hd x A	0.154	0.262
Hd x F	0.070	0.460
<b>Hd x Hdh</b>	<b>0.625</b>	<b>0.007*</b>
Hd x Afdh	0.193	0.204
Hd x Afd	0.054	0.518
Afd x T	0.009	0.795
<b>Afd x P</b>	<b>0.800</b>	<b>0.0005*</b>
Afd x A	0.171	0.235
Afd x F	0.165	0.244
Afd x Hdh	0.095	0.386
Afd x Afdh	0.322	0.087

Hojas dañadas por hongos (Hd), temperatura media anual (T), precipitación media anual (P), altura (A), número de frutos (F), hojas dañadas por herbivoría (Hdh), área foliar dañada por herbivoría (Afdh) y área foliar dañada por hongos (Afd).

**Tabla 5. Correlaciones por individuo por sitio entre los factores bióticos con los niveles de daño foliar.**

Correlación	R <sup>2</sup>	P
<b>Hd x A</b>	<b>0.227</b>	<b>&lt;0.0001*</b>
<b>Hd x F</b>	<b>0.258</b>	<b>&lt;0.0001*</b>
<b>Hd x Hdh</b>	<b>0.077</b>	<b>0.0086*</b>
Hd x Afdh	0.016	0.231
<b>Hd x Afd</b>	<b>0.175</b>	<b>&lt;0.0001*</b>
<b>Afd x A</b>	<b>0.045</b>	<b>0.045*</b>
Afd x F	0.005	0.517
<b>Afd x Hdh</b>	<b>0.055</b>	<b>0.027*</b>
Afd x Afdh	0.011	0.334

Hojas dañadas por hongos (Hd), altura (A), número de frutos (F), porcentaje de hojas dañadas por herbivoría (Hdh), porcentaje de área foliar dañada por herbivoría (Afdh) y área foliar dañada por hongos (Afd).

SECUENCIA ITS1  
 SECUENCIA 5.8S  
 SECUENCIA ITS2

ACCNNGAGTTGTAGGCTTTGNCTGCNATCTCTTACCCATGTCTTTTANGTACCTTCGTTTCCTCGGCGGG  
 TCCNCCCGCAATTGGACAATTTAAACCATTTGCAGTTGCAATCANCNCGTCNGAAA  
 AACTTTAATANTTAC  
 AACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGA  
 ATTGAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTTGGTATTCATGGGGCATGC  
 CTGTTGAGCGTCATTTGTACCTTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGTGTTTGTCTCGCCTCTGCGCGCAGA  
 CTCGCTCAAACAATTTGGCAGCCGGCGTATTGATTTGCGAGCGAGTACATCTCGCGCTTTGCACTCAG  
 AACGACGACGTCCAAAAGTACATTTTTTACACTCTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGNGAACTTA  
 AGCATATCAT

**Figura 14. Secuencias obtenidas del fragmento de ADN producido en la PCR.**

|JF923823.1| Phoma tropica strain I2812 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length=541

Score = 342 bits (185), Expect = 4e-91

Identities = 185/185 (100%), Gaps = 0/185 (0%)

Strand=Plus/Plus

```
Query 1   GTACCTTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGTGTTTGTCTCGCCTCTGCGCGCAGACTCGCCT 60
          |||
Sbjct 313 GTACCTTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGTGTTTGTCTCGCCTCTGCGCGCAGACTCGCCT 372
Query 61   CAAAACAATTGGCAGCCGGCGTATTGATTTGCGAGCGCAGTACATCTCGCGCTTTGCACT 120
          |||
Sbjct 373 CAAAACAATTGGCAGCCGGCGTATTGATTTGCGAGCGCAGTACATCTCGCGCTTTGCACT 432
Query 121 CAGAACGACGACGTCCAAAAGTACATTTTTTACACTCTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATA 180
          |||
Sbjct 433 CAGAACGACGACGTCCAAAAGTACATTTTTTACACTCTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATA 492
Query 181 CCCGC 185
          |||
Sbjct 493 CCCGC 497
```

|DQ474112.1| Phoma macrostoma strain IMI 336761 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length=523

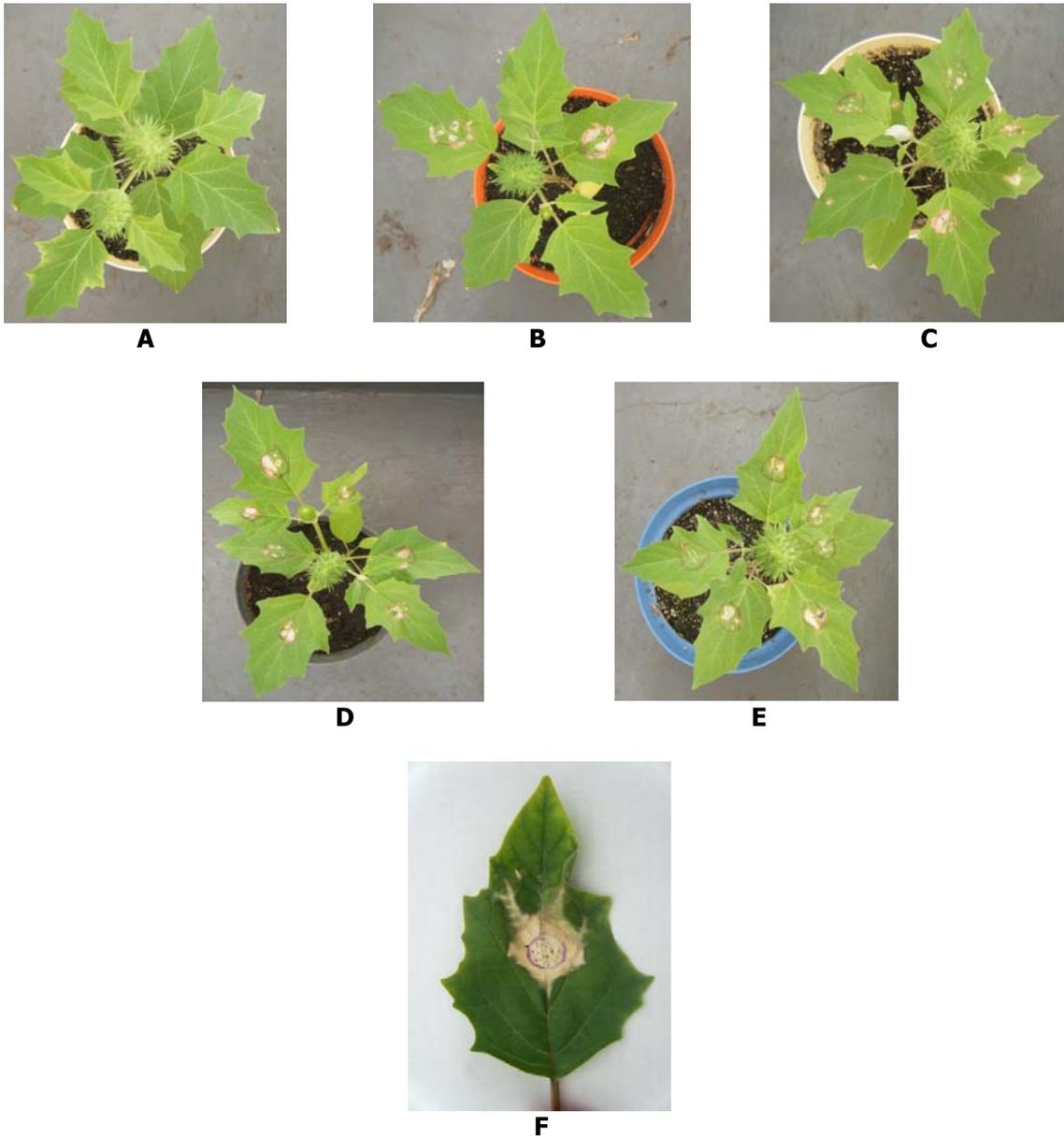
Score = 342 bits (185), Expect = 4e-91

Identities = 185/185 (100%), Gaps = 0/185 (0%)

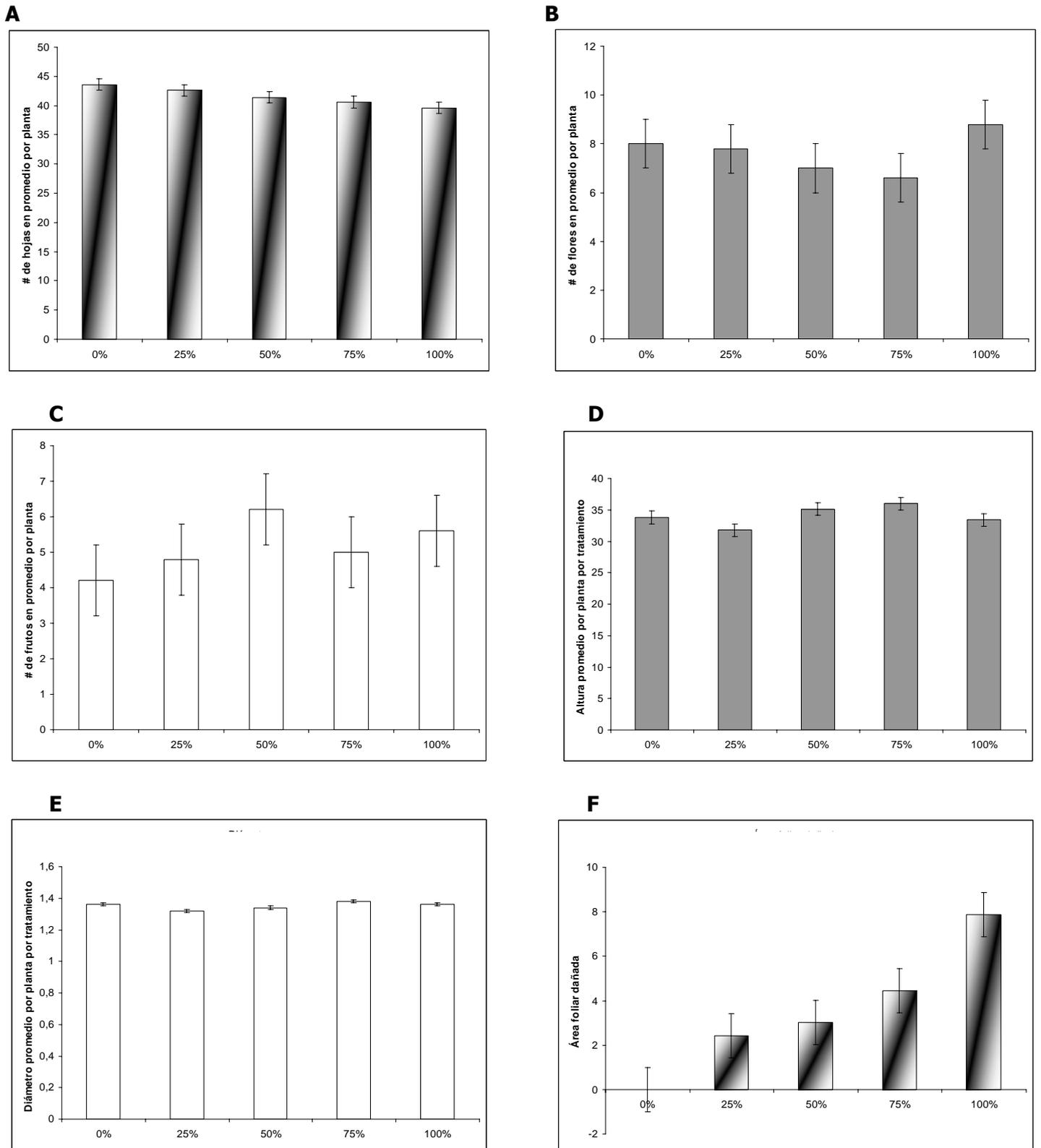
Strand=Plus/Plus

```
Query 1   GTACCTTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGTGTTTGTCTCGCCTCTGCGCGCAGACTCGCCT 60
          |||
Sbjct 330 GTACCTTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGTGTTTGTCTCGCCTCTGCGCGCAGACTCGCCT 389
Query 61   CAAAACAATTGGCAGCCGGCGTATTGATTTGCGAGCGCAGTACATCTCGCGCTTTGCACT 120
          |||
Sbjct 390 CAAAACAATTGGCAGCCGGCGTATTGATTTGCGAGCGCAGTACATCTCGCGCTTTGCACT 449
Query 121 CAGAACGACGACGTCCAAAAGTACATTTTTTACACTCTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATA 180
          |||
Sbjct 450 CAGAACGACGACGTCCAAAAGTACATTTTTTACACTCTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATA 509
Query 181 CCCGC 185
          |||
Sbjct 510 CCCGC 514
```

**Figura 15. Resultados de la alineación con el programa BLAST de la secuencia ITS2.**



**Figura 17. Plantas inoculadas con *Alternaria* sp. en invernadero. Tratamientos con 0 % (A), 25 % (B), 50 % (C), 75 % (D), 100 % (E) de hojas inoculadas. Síntoma desarrollado por las plantas (F).**



**Figura 18. Valores promedio por planta por tratamiento del número de hojas producidas (A), flores (B), frutos(C), altura (D), diámetro (E) y área foliar dañada (F).**

**Tabla 6. Correlaciones del tratamiento con el 0% de hojas inoculadas con la suspensión de micelio-esporas entre los caracteres medidos.**

<b>Correlación</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>P</b>
H x Fl	0.045	0.7312
H x Fr	0.048	0.7237
<b>H x S/Fr</b>	<b>0.775</b>	<b>0.0488*</b>
H x A	0.039	0.7490
H x D	0.362	0.2831
Fl x Fr	0.281	0.3579
Fl x S/Fr	0.102	0.6012
Fl x A	0.009	0.8774
Fl x D	0.014	0.8503
Fr x S/Fr	0.193	0.4592
Fr x A	0.447	0.2176
Fr x D	0.444	0.2191
S/Fr x A	0.389	0.2609
<b>S/Fr x D</b>	<b>0.787</b>	<b>0.0446*</b>
<b>A x D</b>	<b>0.810</b>	<b>0.0373*</b>

Número de hojas (H), número de flores (Fl), número de frutos (Fr), número de semillas producidas por fruto (S/Fr), altura (A) y diámetro (D).

**Tabla 7. Correlaciones del tratamiento con el 25% de hojas inoculadas con la suspensión de micelio-esporas entre los caracteres medidos.**

<b>Correlación</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>P</b>
H x Fl	0.639	0.1044
H x Fr	0.278	0.3614
H x S/Fr	0.058	0.6953
H x A	0.100	0.6036
H x D	0.538	0.1585
Fl x Fr	0.253	0.3882
Fl x S/Fr	0.032	0.7733
Fl x A	0.276	0.3628
Fl x D	0.568	0.1411
<b>Fr x S/Fr</b>	<b>0.879</b>	<b>0.0186*</b>
Fr x A	0.681	0.0854
Fr x D	0.063	0.6850
S/Fr x A	0.595	0.1268
S/Fr x D	9.059e-5	0.9879
A x D	0.215	0.4310
Afd x H	0.753	0.0566
Afd x Fl	0.567	0.1419
Afd x Fr	0.036	0.7613
Afd x S/Fr	0.017	0.8334
Afd x A	0.005	0.9077
Afd x D	0.278	0.3610

Número de hojas (H), número de flores (Fl), número de frutos (Fr), número de semillas producidas por fruto (S/Fr), altura (A), diámetro (D) y Área foliar dañada (Afd).

**Tabla 8. Correlaciones del tratamiento con el 50% de hojas inoculadas con la suspensión de micelio-esporas entre los caracteres medidos.**

<b>Correlación</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>P</b>
<b>H x FI</b>	<b>0.787</b>	<b>0.0446*</b>
<b>H x Fr</b>	<b>0.817</b>	<b>0.0352*</b>
H x S/Fr	0.649	0.0999
H x A	0.502	0.1802
H x D	0.010	0.8750
<b>FI x Fr</b>	<b>0.972</b>	<b>0.0021*</b>
FI x S/Fr	0.354	0.2898
FI x A	0.410	0.2442
FI x D	0	1.0000
Fr x S/Fr	0.322	0.3182
Fr x A	0.335	0.3070
Fr x D	0.005	0.9103
S/Fr x A	0.279	0.3604
S/Fr x D	0.127	0.5566
A x D	0.143	0.5302
<b>Afd x H</b>	<b>0.843</b>	<b>0.0278*</b>
Afd x FI	0.640	0.1044
Afd x Fr	0.625	0.1117
<b>Afd x S/Fr</b>	<b>0.900</b>	<b>0.0139*</b>
Afd x A	0.292	0.3475
Afd x D	0.083	0.6375

Número de hojas (H), número de flores (FI), número de frutos (Fr), número de semillas producidas por fruto (S/Fr), altura (A), diámetro (D) y Área foliar dañada (Afd).

**Tabla 9. Correlaciones del tratamiento con el 75% de hojas inoculadas con la suspensión de micelio-esporas entre los caracteres medidos.**

<b>Correlación</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>P</b>
H x FI	0.444	0.2194
H x Fr	0.099	0.6065
H x S/Fr	0.457	0.2103
H x A	0.264	0.3757
H x D	0.475	0.1981
FI x Fr	0.006	0.9030
FI x S/Fr	0.579	0.1355
FI x A	0.071	0.6640
FI x D	0.402	0.2507
Fr x S/Fr	0.308	0.3319
Fr x A	0.152	0.5172
Fr x D	0.571	0.1393
S/Fr x A	0.022	0.8127
S/Fr x D	0.524	0.1667
A x D	0.022	0.8134
Afd x H	0.192	0.4606
Afd x FI	0.017	0.8369
Afd x Fr	0.169	0.4912
Afd x S/Fr	0.018	0.8297
Afd x A	0.288	0.3508
Afd x D	0.229	0.4152

Número de hojas (H), número de flores (FI), número de frutos (Fr), número de semillas producidas por fruto (S/Fr), altura (A), diámetro (D) y Área foliar dañada (Afd).

**Tabla 10. Correlaciones del tratamiento con el 100% de hojas inoculadas con la suspensión de micelio-esporas entre los caracteres medidos.**

<b>Correlación</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>P</b>
H x Fl	0.751	0.0574
H x Fr	0.365	0.2803
H x S/Fr	0.094	0.6153
H x A	0.236	0.4068
H x D	0.132	0.5473
Fl x Fr	0.352	0.2920
Fl x S/Fr	0.025	0.7985
Fl x A	0.0002	0.9806
Fl x D	0.008	0.8867
Fr x S/Fr	0.017	0.8366
Fr x A	0.040	0.7483
Fr x D	0.207	0.4412
S/Fr x A	0.126	0.5572
S/Fr x D	0.0004	0.9737
A x D	0.292	0.3470
Afd x H	0.025	0.7981
Afd x Fl	0.186	0.4680
Afd x Fr	0.003	0.9366
Afd x S/Fr	0.419	0.2376
Afd x A	0.181	0.4758
Afd x D	0.068	0.6714

Número de hojas (H), número de flores (Fl), número de frutos (Fr), número de semillas producidas por fruto (S/Fr), altura (A), diámetro (D) y Área foliar dañada (Afd).