

Identificación molecular de *Fusarium* spp. aislados de maíz en Sinaloa, México

Sixto Velarde Félix¹

Nallely Valdez Rubio²

Francisco Zamora Galván³

Ramón López Molina²

Claudia María Melgoza Villagómez⁴

José Antonio Garzón Tiznado^{5§}

¹Campo Experimental Valle de Culiacán-INIFAP. Carretera Culiacán-Eldorado km 17.5, Culiacán, Sinaloa, México. CP. 80000. (velarde.sixto@inifap.gob.mx). ²Universidad Autónoma de Sinaloa-Facultad de Agronomía. Carretera Culiacán-Eldorado km 17.5, Culiacán, Sinaloa, México. CP. 80000. (nava.will@hotmail.com; ramón_lm16@hotmail.com). ³Centro de Bachillerato Tecnológico Agropecuario Núm. 247. Prolongación Tampico núm. 22, Jala, Nayarit. CP 63880. (Francisco-zg15@hotmail.com). ⁴Sitio Experimental Valle de Santo Domingo-INIFAP. Carretera Transpeninsular km 208, Cd. Constitución, Baja California Sur, México. CP. 23600. (cmelgozavillagomez@gmail.com). ⁵Universidad Autónoma de Sinaloa-Facultad de Ciencias Químico Biológicas. Av. de Las Américas y Blvd. Universitarios s/n, Culiacán, Sinaloa, México. CP. 80013.

§Autor para correspondencia: garzon24@hotmail.com.

Resumen

Especies de *Fusaria* ocasionan en el maíz enfermedades de tipo vascular que inducen pudriciones de tallos, raíces y granos de mazorca y finalmente la muerte de la planta. En el presente estudio se identificó molecularmente la presencia y diversidad de especies del género *Fusarium* asociadas a estos daños en Sinaloa. Durante los periodos de siembra en los años 2013-2014 se colectó tejido de tallo y raíz de plantas jóvenes y adultas, así como granos de mazorcas enfermas, en los municipios de Ahome, Culiacán y Elota en el estado de Sinaloa. En esta investigación se identificaron mediante análisis de secuenciación enzimática las especies *F. verticillioides*, *F. oxysporum*, *F. subglutinans*, *F. equiseti*, *F. nygamai*, *F. cf. bullatum* y *F. andiyazi*, en donde *F. verticillioides* fue la especie más predominante. Asimismo, se reporta por primera vez la presencia en México de *Fusarium cf. bullatum* causando daños en el maíz.

Palabras clave: *Zea mays* L., *Fusaria*, secuenciación enzimática.

Recibido: octubre de 2018

Aceptado: diciembre de 2018

Introducción

México es el centro de origen y diversidad del maíz (*Zea mays* L.), lo que ha dado lugar a un mayor número de razas de maíz endémicas, variedades y genotipos silvestres Centro de Estudios para el Cambio en el Campo Mexicano (Ceecam, 2012). En América Latina se han descrito cerca de 220 razas de maíz (Goodman y Bird, 1977), de las cuales 64 se han identificado y descrito en su mayoría para México (Anderson, 1946; Hernández y Alanís, 1970; Sánchez *et al.*, 2000).

Las razas de maíz de México se han agrupado, con base en caracteres morfológicos, de adaptación y genéticos (isoenzimas) en siete grupos o complejos raciales (Goodman y Bird, 1977; Sánchez *et al.*, 2000). El INIFAP y sus antecesores desde 1942 han desarrollado y liberado más de 250 variedades e híbridos de maíz, que en algunos casos no han sido suficientes y debe reconocerse que en general la investigación, desde sus inicios, ha privilegiado la agricultura de mayor potencial productivo (Espinosa *et al.*, 2009). El cultivo de maíz ocupó el primer lugar por área sembrada en México con 7.6 millones de has, y una producción total de 19 504 050 t (SIAP, 2015).

Todas las entidades del país presentan algún nivel de producción de este cultivo; sin embargo, siete concentran 64.5% del volumen, siendo el estado de Sinaloa el principal productor con 20.7% en una superficie cosechada de 359, 400 ha (SIAP, 2015). Entre las enfermedades de mayor importancia económica se encuentra las causadas por el género *Fusarium* sp. (Hernández *et al.*, 2016) ya que es un microorganismo con una gran diversidad de especies, formas especiales y razas, asociadas con enfermedades de plantas (Leslie y Summerell, 2006). Las especies fitopatógenas de este género constituyen un grupo de hongos filamentosos que están ampliamente distribuidas en el suelo y que colonizan las partes aéreas y subterráneas de una amplia gama de especies de plantas, generando síntomas de amarillez, marchitez, pudrición radicular, chancros y finalmente la muerte de muchos cultivos (Leslie y Summerell, 2006).

En diversos países, se han encontrado una gran diversidad de especies de *Fusarium* infectando plantas (Mesterházy *et al.*, 2012). En México se ha documentado la diversidad de especies de *Fusarium* que generan pudriciones en poblaciones comerciales y nativas de maíz (Morales *et al.*, 2007; García y Martínez, 2010; Leyva *et al.*, 2014; Briones *et al.*, 2015).

Además de su comportamiento fitopatógeno, especies del género *Fusarium*, en su proceso de infección, sintetizan metabolitos secundarios denominados micotoxinas, dentro de las cuales se han descrito las del grupo zearalenona, tricotecenos y fumonisinas (Eckard *et al.*, 2011), que son de alta toxicidad y que generan al ser humano y animales disturbios en la salud.

Se tienen reportes que *F. solani* (Martius) Apple & Wollenweber emend. Snyder & Hansen (teleomorfo= *Nectria haematococca* (Berkeley & Broome) Samuel & Niberberg), *F. oxysporum* Schlechten emend. Snyder & Hansen (sin reproducción sexual) y *F. verticilloides* (Saccardo) Nirenberg (anteriormente llamado *F. moniliforme* (teleomorfo= *Gibberella moniliformis* Wineland) son las especies que ocasionan daños al ser humano (Tezcan *et al.*, 2009; de Souza *et al.*, 2014); sin embargo, recientemente se diagnosticó a *F. subglutinans* Wollenber & Reiking Nelson, Toussoun & Marasas (teleomorfo= *Gibberella subglutinans* Nelson, Toussoun & Marasas (Campos *et al.*, 2013) y *F. napiforme* Marasas, Nelson & Rabie (sin reproducción sexual) que causan micosis en humano (de Souza *et al.*, 2014) y dañan a gramíneas (Leslie y Sumerell, 2006).

Fusarium proliferatum (Matsushima) Nirenberg (teleomorfo= *Gibberella intermedia* (Kuhlman) Samuels, Nirenberg & Seifert), *F. subglutinans* y *F. verticillioides* son las especies más conocidas como agentes causales del daño de la raíz y mazorca del maíz a nivel mundial (Bertechini *et al.*, 2012; Kauret *et al.*, 2014), en México, *F. verticillioides* y *F. subglutinans* (Morales *et al.*, 2007; Figueroa *et al.*, 2010; López *et al.*, 2014) han sido los más reportados en esta enfermedad.

El género *Fusarium* también es conocido por sus dificultades taxonómicas en la definición e identificación de especies a nivel morfológico, de ahí la pertinencia de integrar otros elementos como la caracterización patogénica y molecular que además han demostrado ser fiable en la evaluación de la diversidad genética dentro de este organismo (Bacon *et al.*, 1994). Actualmente las técnicas de biología molecular basadas en la PCR con el uso de iniciadores específicos y marcadores moleculares han sido utilizadas para la identificación de especies de *Fusarium*. Se ha reportado el uso del gen parcial de la calmodulina para la identificación de *F. verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. subglutinans* (Mulé *et al.*, 2004).

Otra alternativa es el gen del factor de elongación 1 alfa (EF-1 α o TEF), el cual codifica para una proteína esencial de la maquinaria de traducción. Su utilidad filogenética reside en que su secuencia es altamente conservada a nivel de género *Fusarium*, por lo cual se han diseñado iniciadores para una mejor oportunidad de separar especies, cuyos productos amplificados generan un fragmento de ~700 pb flanqueando 3 intrones (O'Donnell *et al.*, 1998; Geiser *et al.*, 2004). Por otro lado, los ITS (Lin *et al.*, 2014), los RAPDs (Kauret *et al.*, 2014) y los RFLPs (Hsuan *et al.*, 2010) también se utilizan como herramientas moleculares para la identificación de especies de *Fusarium*. El objetivo del presente estudio fue conocer las especies de *Fusaria* que causan enfermedades en el cultivo del maíz, en siembras de riego del ciclo otoño-invierno en el estado de Sinaloa, México.

Materiales y métodos

El trabajo se realizó durante los ciclos agrícolas primavera-verano, otoño-invierno 2012-2013 y 2013-2014, colectando plántulas, plantas adultas y mazorcas de maíz en diferentes sitios agrícolas en los Municipios de Ahome, Culiacán y Elota en el estado de Sinaloa (Figura 1). La investigación de laboratorio se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Campo Experimental Valle de Culiacán del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), 24° 37' 59.3" latitud norte, 107° 26' 31.0" longitud oeste a 54 msnm, en Culiacán, Sinaloa.

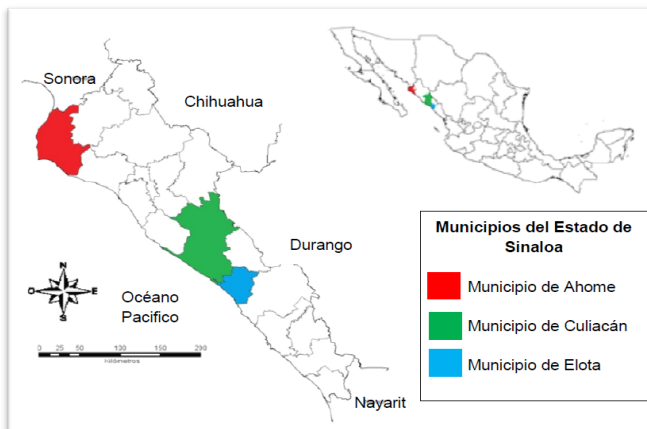


Figura 1. Localización del área de estudio.

Aislamiento de cultivos monospóricos de *Fusaria*

Tejidos de tallo de plántulas y plantas de maíz colectadas se cortaron en trozos longitudinales de 3 mm además de granos de mazorcas, los cuales fueron desinfestados superficialmente con hipoclorito de sodio al 2% por 2 min y etanol al 70% por 2 min, seguido de tres lavados consecutivos con agua destilada estéril. Para el crecimiento y desarrollo del hongo, el tejido vegetal fue colocado en cajas de Petri con medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA-Difco) suplementado con 1.5 mL L⁻¹ de PCNB (pentacloronitrobenzeno) y cefuroxima (200 mg L⁻¹), incubándose a una temperatura de 25 °C durante cinco días. La identificación del hongo se realizó en un microscopio compuesto (Olympus Cx31), con base a la morfología del micelio, microconidias y macroconidias propuestas por Leslie y Summerell, (2006).

Para obtener cultivos monospóricos de *Fusaria*, se cortó un pequeño fragmento del micelio crecido en medio PDA, el cual contenía el fungicida PCNB y cefuroxima, resuspendido en 1 mL de agua destilada estéril y mediante un hematocitómetro se contaron el número de conidias en diluciones seriadas (Hernández y Rangel, 2011), a partir de éstas se obtuvieron alícuotas que fueron distribuidas sobre medio PDA en cajas Petri, a partir de donde se obtuvo el cultivo monospórico. El crecimiento del hongo fue observado al microscopio compuesto, ubicando esporas individuales germinadas, las cuales fueron seleccionada y transferidas individualmente a una nueva caja de Petri con medio PDA suplementado con PCNB y cefuroxima. Estas se incubaron bajo las mismas condiciones antes mencionadas. Un pequeño trozo de medio PDA con el hongo desarrollado fue transferido a tubos de ensaye que contenían arena tamizada estéril (8 x 10 hilos cm⁻³) con medio líquido Komada (Komada, 1975) y fueron almacenados en un refrigerador a una temperatura de 4°C para su preservación y uso posterior.

Extracción de ADN de cultivos monospóricos

Para la extracción del ADN, se empleó el método previamente descrito (Velarde *et al.*, 2015), para ello el micelio del hongo fue obtenido raspando con una asa bacteriológica estéril a partir del medio sólido, este fue colocado en mortero y pistilo de porcelana, previamente esterilizados durante 5 min en un horno de microondas electrodoméstico (LG, modelo MS-1446SQP/01), funcionando en la frecuencia de las microondas, en torno a los 2.45 GHz (GigaHertz) y finalmente enfriados a -70 °C. Después se agregó 1 mL de amortiguador de extracción que contenía: NaCl 30 mM, ácido etilendinitrilotetracético 30 mM (EDTA) y Tris Base 250 mM (pH 8.5), con el cual fue macerado. El producto de la maceración se colocó en tubos Eppendorf de 1.5 mL con su respectiva etiquetación. Enseguida se añadió a la muestra 100 L de cetiltrimetilbromuro de amonio al 10% (CTAB) y 250 L de Cloruro de Sodio 5M (NaCl) incubándose a 95 °C durante 10 min y posteriormente fue centrifugada a 12 000 rpm durante 10 min; transcurrido este tiempo, la solución acuosa (sobrenadante) fue transferida a un tubo nuevo. A la solución acuosa se le añadió un volumen de cloroformo frío (v/v) y se agitó en un equipo vortex durante unos segundos y posteriormente se centrifugó a 10 000 rpm durante 5 min, una vez transcurrido este tiempo, la solución acuosa fue transferida a un tubo nuevo, agregándosele un volumen de isopropanol absoluto frío y agitándose manualmente.

Posteriormente, las muestras fueron almacenadas durante una hora a -20 °C para permitir la precipitación del ADN. Ocurrido este tiempo, las muestras en tubos fueron centrifugadas a 12 000 rpm durante 10 min para obtener la pastilla de ADN, la cual se dejó secar a temperatura de

laboratorio por dos horas, finalmente el ADN obtenido de los diferentes aislamientos se re suspendieron en 50 L de agua libre de nucleasas (Promega) y almacenado a 4 °C para su conservación.

Análisis mediante PCR

Un grupo de pares de iniciadores fueron empleados para el análisis por la PCR, del ADN de *Fusaria*, que originalmente se describieron para separar especie-específica y que en nuestro caso los empleamos para generar información de primera mano para estudios epidemiológicos sobre la incidencia de *Fusaria*: el par FOF1/FOR1 para *F. oxysporum* (Mishra *et al.*, 2003), VER1/2, PRO1/2 y SUB1/2 para especie-específica tales como *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. subglutinans* (Mulé *et al.*, 2004) respectivamente (Cuadro 1). Para la reacción se utilizó un termociclador (Nyx Technik Amplitronyx series 6 A6 (ATC401) Thermal Cycler). La mezcla de reacción final (15 µL) contenía 100 ng de ADN, una mezcla equimolar de dATP, dCTP, dGTP y dTTP, MgCl₂, amortiguador de PCR, ADN *Taq* polimerasa (provisto por Promega® PCR Master Mix, Catalogo No. M7502), 40 pmoles de cada oligonucleótido (Sigma®).

Cuadro 1. Iniciadores específicos, empleados para la amplificación de fragmentos predichos para especies de *Fusaria*.

Nombre del iniciador	Secuencias de iniciadores 5'→3'	Especies específicas
SUB1	CTGTCGCTAAACCTCTTTATCCA	<i>F. subglutinans</i> ^a
SUB2	CAGTATGGACGTTGGTATTATATCTAA	
PRO1	CTTTCCGCCAAGTTTCTTC	<i>F. proliferatum</i> ^a
PRO2	TGTCAGTAACTCGACGTTGTTG	
VER1	CTTCCTGCGATGTTTCTCC	<i>F. verticillioides</i> ^a
VER2	AATTGGCCATTGGTATTATATATCTA	
FOF	ACATACCACTTGTTCCTCG	<i>F. oxysporum</i> ^b
FOR	CGCCAATCAATTTGAGGAACG	
EF1	ATGGGTAAAGGA(A/G)GACAAGAC	<i>Fusaria</i> ^{c,d}
EF2	GGA(G/A)GTACCAGT(G/C)ATCATGTT	

^a= Mulé *et al.* (2004); ^b= Mishra *et al.* (2003); ^c= O'Donnell *et al.* (1998); ^d= Geiser *et al.* (2004).

Las condiciones de amplificación para *F. oxysporum* fueron: 1 ciclo a 95 °C, 5 min; 30 ciclos (95 °C, 1 min; 53 °C, 1 min; 72 °C, 1 min) y un ciclo de extensión final a 72 °C, 10 min y 4 °C, mientras que para *F. verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. subglutinans* consistieron en: 1 ciclo a 95 °C, 5 min; 30 ciclos (95 °C, 1 min; 56 °C, 1 min; 72 °C, 1 min), un ciclo de extensión final a 72 °C, 10 min y 4 °C. Los productos amplificados fueron analizados en geles de agarosa al 1%, teñidos con una solución de Gel Red (Biotium, catálogo núm. 41003).

Con la finalidad de confirmar la identidad de las especies detectadas con el juego de iniciadores antes descritos, se realizó un segundo análisis de PCR en donde fueron seleccionados el par de iniciadores correspondientes a la región del gen TEF, para ello fueron seleccionados ADNs de 33 cepas monospóricas. Los pares de iniciadores EF1 y EF2 (O'Donnell *et al.*, 1998; Geiser *et al.*, 2004) (Cuadro 1) fueron usados con una temperatura de alineamiento de 55 °C.

Secuenciación enzimática

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

Postulado de Koch de *Fusarium cf. Bullatum*

Las semillas del maíz criollo Aperlado fueron obtenidas del banco de germoplasma del maíz del Campo Experimental Valle de Culiacán-INIFAP. Para la preparación del inóculo del hongo (número de accesión en el GenBank-NCBI, KR612339), este fue crecido en medio de cultivo PDA suplementado con PCNB (1.5 mL L^{-1}) y cefuroxima (200 mg L^{-1}) durante una semana, a 25°C . De este medio, se cortaron ocho fragmentos de micelio y fueron depositados en un matraz con medio AMA (arena 450 g, harina de maíz 50 g, agua estéril 50 mL) incubados bajo las mismas condiciones durante 15 días. La desinfección de las semillas de maíz fueron lavadas en una solución de hipoclorito de sodio al 3% durante 3 min y posteriormente enjuagadas en agua destilada estéril y para su germinación estas fueron depositadas en una incubadora a 25°C durante 48 h.

Germinadas las semillas, estas fueron seleccionadas por uniformidad en tamaño, depositando una plántula por maceta. Para la preparación de la tierra-sustrato, se realizó una mezcla de tierra muerta (1.5 kg), turba (0.5 kg) y medio AMA (0.250 kg) (con inóculo del hongo) y 600 g de esta mezcla fueron depositados en macetas previamente esterilizadas. La cantidad de inóculo para esta especie fue $5\,000 \text{ ufc g}^{-1}$ de suelo. El experimento fue realizado con base al protocolo de Trapero y Jiménez (1985) y Navas *et al.* (2007) en un invernadero bajo condiciones controladas a temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$ y un fotoperiodo de 12 h, durante 60 días. Se realizaron dos repeticiones de macetas incluidos los testigos sin inóculo.

Análisis filogenético

La alineación de las secuencias nucleotídicas del factor de elongación EF-1 α de especies de *Fusarium* se realizó con el método Clustal W y el dendograma se construyó con el método de Máxima Parsimonia usando el algoritmo SPR (Nei y Kumar, 2000) y un bootstrap de 1000 réplicas (Felsenstein, 1985). Todos los análisis se realizaron con el programa MEGA versión 6.0 (Tamura *et al.*, 2013).

Resultados y discusión

Identificación molecular de *Fusarium* spp mediante PCR

Se obtuvieron 116 cultivos monospóricos, 25 aislados de plántula, 36 de planta adulta y 55 de mazorca, todas ellas con daños de pudrición a los cuales se identificó al género *Fusarium* mediante la morfología de las microconidias bicelulares, macroconidias septadas y en forma de ‘canoa’ y el micelio septado, de acuerdo a las claves propuestas por Leslie y Summerell (2006) (Figura 2).

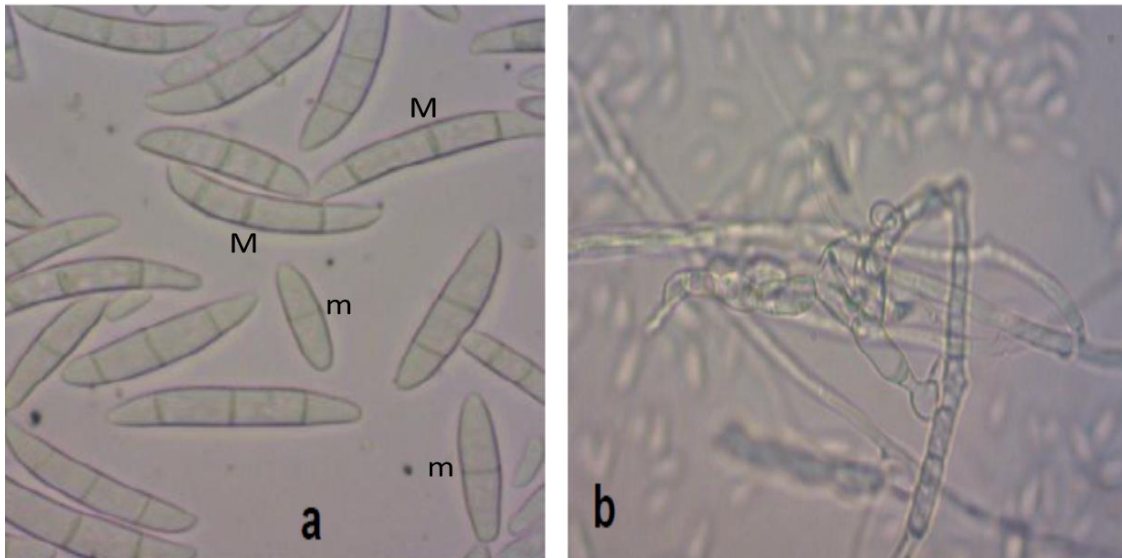


Figura 2. Morfología de *Fusaria*: a) microconidias (m), macroconidias (M); b) micelio.

A cada aislado monospórico se les extrajo el ADN para la amplificación específica mediante PCR con el empleo de iniciadores descritos para las especies: *F. oxysporum*, *F. verticilloides*, *F. subglutinans* y *F. proliferatum* (Cuadro 1). De las 116 muestras que morfológicamente fueron identificadas como *Fusarium* spp., 35 (30.17%) amplificaron el fragmento predicho de 350 pb, para *F. oxysporum* (Figura 3), especie que se ha mencionado causando daños vasculares en este cultivo en el estado de Puebla, México (García y Martínez, 2010).

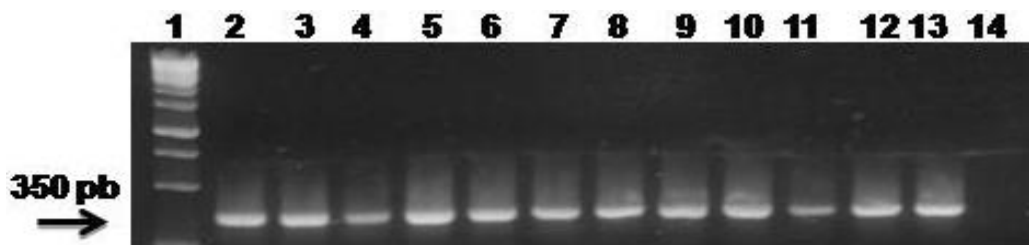


Figura 3. Análisis electroforético en agarosa al 1%. Amplificación del fragmento de 350 pb mediante PCR con iniciadores FOF y FOR específicos para detectar a *F. oxysporum*. Carriles: 1= Gene Ruler 1Kb DNA Ladder; 2-12= ADN de *Fusarium* obtenido de maíz enfermo colectado en diferentes localidades del estado de Sinaloa; 13= control positivo (ADN de *F. oxysporum*) y 14= control negativo (sin ADN).

El ADN extraído del total de cepas monospóricas, 70 muestras amplificaron con los iniciadores para *F. verticilloides* (60.34%), esta especie que presentó mayor frecuencia de amplificaciones en este estudio, que confirma su prevalencia mundial (Gimeno y Martins, 2011). Estudios recientes indican que *F. verticilloides* es la especie causante de daños de la pudrición de la raíz y el tallo en el maíz en el estado de Sinaloa (López *et al.*, 2014). En la Figura 4, se observan los fragmentos amplificados con un tamaño predicho de 578 pb descritos para la especie *F. verticilloides* (Cuadro 1).

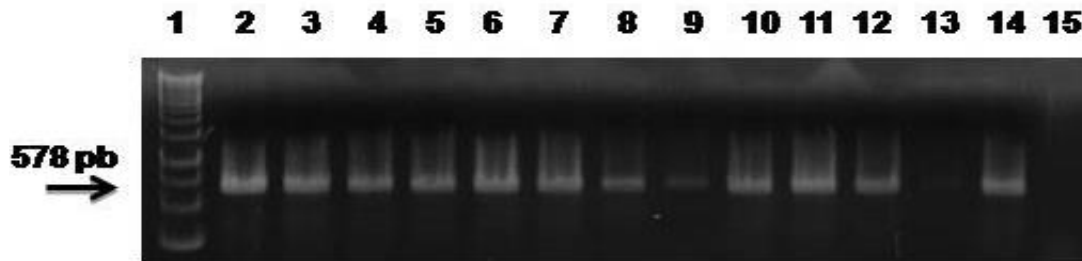


Figura 4. Análisis electroforético en agarosa al 1%. Amplificación del fragmento de 578 pb mediante PCR con iniciadores VER1 y VER2 específicos para detectar a *F. verticilloides*. 1= Gene Ruler 1Kb DNA Ladder, 2-13= ADN de *Fusarium* de maíz enfermo colectado en localidades de Sinaloa, 14= control positivo (ADN de *F. verticilloides*); 15= control negativo (sin ADN).

Sólo tres de las 116 muestras analizadas amplificaron con los iniciadores correspondientes a *F. subglutinans* (2.59%). En la Figura 5, se observan los fragmentos amplificados con un tamaño predicho de 631pb. A nivel mundial esta especie después de *F. verticilloides* es el segundo agente causal de la pudrición radicular del maíz (Gimeno y Martins, 2011). En México *F. subglutinans*, se ha encontrado en el estado de Guanajuato (Figuroa *et al.*, 2010) y en el Estado de México (Morales *et al.*, 2007; Rivas *et al.*, 2011).



Figura 5. Análisis electroforético en agarosa al 1%. Amplificación del fragmento de 631 pb mediante PCR con iniciadores SUB1 y SUB2 específicos para detectar a *F. subglutinans*. 1= Gene Ruler 1Kb DNA Ladder; 2-6= ADN de *Fusarium* obtenido de maíz enfermo colectado en localidades de Sinaloa; 6= control positivo (ADN de *F. subglutinans*); 7= control negativo (sin ADN).

En cuanto a la detección con los iniciadores específicos de *F. proliferatum*, no se observaron amplificaciones, en las ocho muestras de ADN analizadas, las cuales fueron amplificadas con los iniciadores TEF y que se incluyeron entre las 33 muestras secuenciadas.

Secuenciación enzimática

De los 116 amplificados que en total se obtuvieron, 32 fragmentos fueron secuenciados. La identidad de las secuencias en nuestro estudio, manifestaron una alta similaridad para siete diferentes especies. En el Cuadro 2, se observan los números de accesoión en el NCBI, tejido donde

fueron aisladas, localización y el porcentaje de homología. Para ello, cada una de nuestras accesiones fue comparada con la base de datos del Centro Nacional para la Información de Biotecnología (NCBI-USA), lo que generó los valores de homología con cada accesión descrita para las diferentes especies, de donde se confirmó la identidad de: *F. verticilloides*, *F. oxysporum*, *F. subglutinans*, *F. nygamai* Burgess & Trimboli (teleomorfo: *Gibberella nygamai* Klaasen & Nelson), *F. andiyazi* Marasas, Rheeder, Lamprecht, Zeller & Leslie (sin reproducción sexual), *F. cf. bullatum* y *F. equiseti* (Corda) Saccardo (teleomorfo: *Gibberella intricans* Wollenweber) cuyos números de accesión se describen en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Identidad de especies de *Fusarium* basado en la secuenciación del gen TEF(EF-1 α).

Cepa	Localización	Tejido	Accesión al GenBank	Asociación basada en la secuencia	Identidad (%)	Accesión comparada del GenBank
526MC	Ahome	Mazorca	JN806238	<i>F. verticilloides</i>	100%	JF740729
527MC	Ahome	Mazorca	JN806239	<i>F. verticilloides</i>	100%	JF740729
528MC	Ahome	Mazorca	JN806240	<i>F. verticilloides</i>	100%	JF740729
529MC	Ahome	Mazorca	JN806241	<i>F. verticilloides</i>	100%	JF740729
530MC	Ahome	Mazorca	JN806242	<i>F. verticilloides</i>	100%	JF740729
532MC	Ahome	Mazorca	JN806243	<i>F. verticilloides</i>	100%	JF740729
533MC	Ahome	Mazorca	JN806244	<i>F. verticilloides</i>	100%	JF740729
536MC	Ahome	Mazorca	JN806245	<i>F. verticilloides</i>	100%	JF740729
538MC	Ahome	Mazorca	JN806246	<i>F. verticilloides</i>	100%	JF740729
610CS	Culiacán	Plántula	KR905566	<i>F. verticilloides</i>	100%	JF740729
613CUL	Culiacán	Plántula	KF753752	<i>F. cf. bullatum</i>	99%	JX268977
622CS	Culiacán	Plántula	KR905551	<i>F. verticilloides</i>	100%	JF740729
623MS	Ahome	Plántula	KR905567	<i>F. cf. bullatum</i>	100%	JX268977
627CS	Culiacán	Plántula	KR905552	<i>F. verticilloides</i>	100%	JF740729
630CS	Culiacán	Plántula	KR905553	<i>F. verticilloides</i>	100%	JF740729
635CS	Culiacán	Plántula	KR905554	<i>F. verticilloides</i>	100%	JF740729
638ES	Elota	Plántula	KR905555	<i>F. verticilloides</i>	100%	JF740729
646ES	Elota	Plántula	KR905556	<i>F. verticilloides</i>	100%	JF740729
649ES	Elota	Plántula	KR905557	<i>F. verticilloides</i>	100%	JF740729
652MS	Ahome	Plántula	KR905558	<i>F. nygamai</i>	100%	JF740790
655ES	Elota	Planta adulta	KR905559	<i>F. verticilloides</i>	100%	JF740729
663ES	Elota	Planta adulta	KR905560	<i>F. verticilloides</i>	100%	JF740729
676ES	Elota	Planta adulta	KR905562	<i>F. verticilloides</i>	100%	JF740729
677CS	Culiacán	Planta adulta	KR905563	<i>F. verticilloides</i>	100%	JF740729
678CS	Culiacán	Planta adulta	KR612341	<i>F. nygamai</i>	100%	JF740790
680MS	Ahome	Planta adulta	KR706385	<i>F. equiseti</i>	91%	KF514661
681CS	Culiacán	Plántula	KR706384	<i>F. equiseti</i>	91%	KF514661
706ES	Elota	Plántula	KR612339	<i>F. cf. bullatum</i>	100%	JX268977
771CS	Culiacán	Planta adulta	KR706383	<i>F. subglutinans</i>	99%	DQ837698
777ES	Elota	Planta adulta	KR612338	<i>F. andiyazi</i>	99%	KM462947
789ES	Elota	Planta adulta	KR905564	<i>F. oxysporum</i>	99%	KM092371
843CS	Culiacán	Planta adulta	KR612340	<i>F. oxysporum</i>	100%	DQ435354

La especie *F. equiseti* se le ha identificado en la zona del Bajío, Guanajuato, México (Figueroa *et al.*, 2010); sin embargo, Leslie y Summerell (2006) afirman que la especie está considerada como saprofito o invasor secundario; no obstante, Madania *et al.* (2013) lo ha reportado en Siria causando daños en plantas de maíz. En cuanto a *F. nygamai* ha sido identificado en Sinaloa a nivel mundial causando daños (Leyva *et al.*, 2014), aunado que fue identificado en este estudio.

Con respecto a *F. andiyazi* ha sido descrito con daños de pudrición de la mazorca en China (Zhang *et al.*, 2014), Siria (Madania *et al.*, 2013) y también en Sinaloa, México (Leyva *et al.*, 2014). Finalmente, para *F. cf. bullatum* existe un reporte en Irán que informa su aislamiento y daño en el maíz (Rahjoo *et al.*, 2008).

Postulado de Koch de *Fusarium cf. Bullatum*

Después de 60 días de la inoculación bajo condiciones controladas, se observó que el maíz criollo Aperlado fue dañado generando pudrición radicular por *Fusarium cf. bullatum* (Figura 6), posteriormente se aislaron cepas monospóricas y se observaron las macroconidias (4-5-septas) (Figura 7 a, m), microconidias (1-2-septas) (Figura 7 a, m) y fiálides en agar hoja de clavel (CLA) (Figura 7-b). Posteriormente, a una cepa se le aisló el ADN y mediante el gen TEF se identificó molecularmente que es *Fusarium cf. bullatum*. La secuenciación enzimática fue registrada en el banco de genes del NCBI (GenBank-NCBI-USA) con número de acceso KX545253.



Figura 6. Postulado de Koch de *Fusarium cf. bullatum* mostrando daño al maíz del criollo Aperlado bajo condiciones controladas en invernadero.

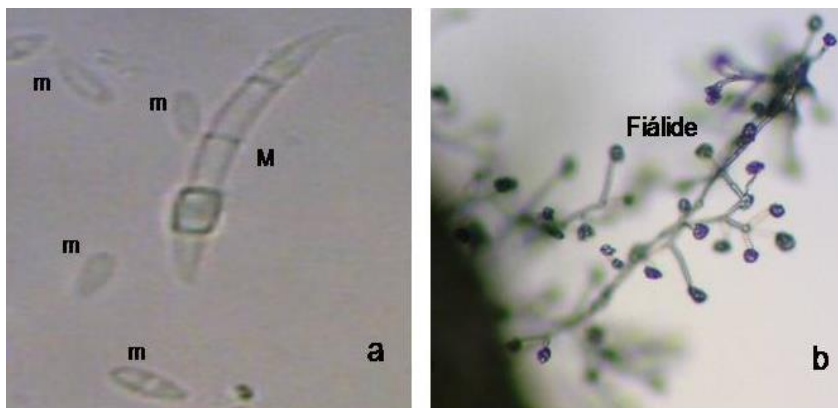


Figura 7. Morfología de *Fusarium cf. bullatum*: a) microconias (m), macroconidias (M); b) fiálides.

Análisis filogenético

La relación filogenética de Máxima Parsimonia del factor de elongación EF-1 α de especies de *Fusarium* se analizó en 32 secuencias con 587 posiciones utilizando el modelo de sustitución nucleotídica SPR (poda y reconexión de un subárbol), que mejor ajustó a EF-1 α . El análisis de las secuencias generó 8 árboles de máxima parsimonia, con índices de consistencia de 83.5% y de retención de 92%, ambos índices de amplia confiabilidad en las comparaciones filogenéticas (Nei y Kumar 2000). El consenso de estos árboles retiene un total de 9 clados.

De acuerdo con el *Fusarium* mating population (Summerell y Leslie, 2006), *F. verticillioides* y *F. andiyazi*, sinónimos de *Gibberella fujikuroi* pertenecen al mating population A, en coincidencia, formaron parte de un mismo grupo en nuestro dendograma (Figura 8). En el cluster de 99% en el que se encuentran *F. oxysporum*, *F. nygamai* y *F. subglutinans*, que previamente se han descrito dentro del mating population G (Summerell y Leslie, 2006); en este análisis, dicha agrupación entre estas especies, también se reflejó en el dendograma (Figura 8).

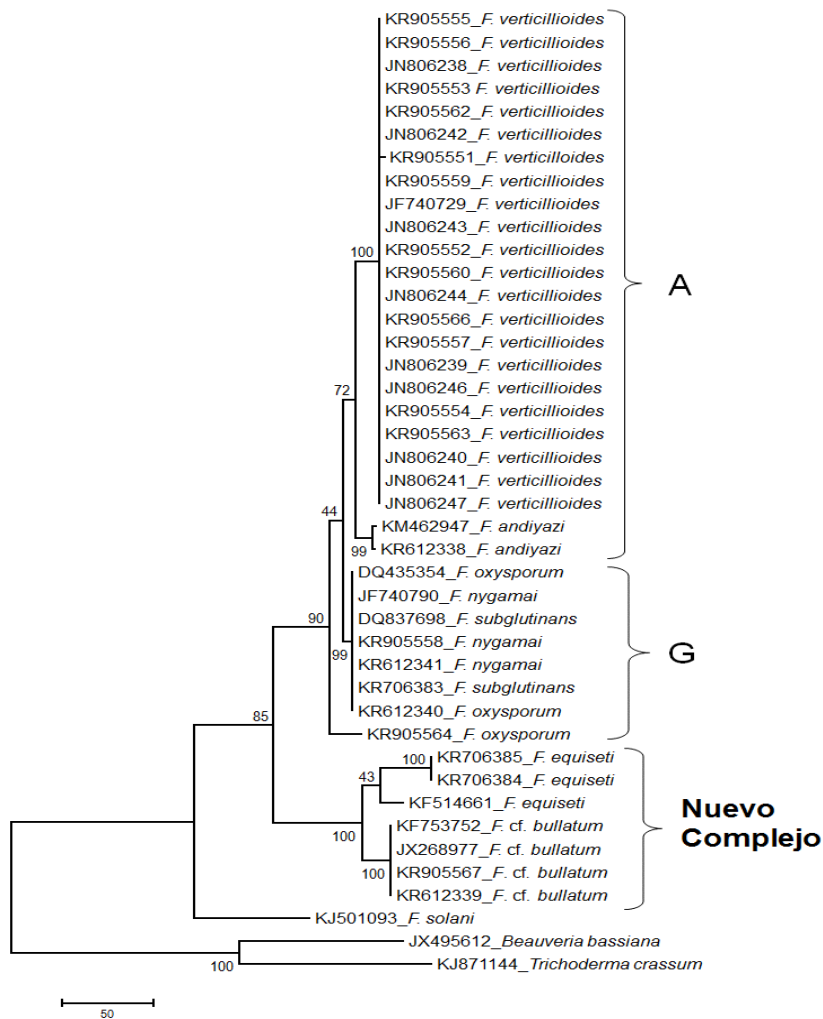


Figura 8. Dendrograma de Máxima Parsimonia basado en secuencias del factor de elongación EF-1 α de especies de *Fusarium*. El dendrograma se construyó con 32 secuencias nucleotídicas, analizando 587 posiciones y un índice de Felsenstein de 1 000 réplicas.

El cluster donde se agrupan *F. equiseti* y *F. cf. bullatum*, está separado del mating population A y G, el cual recientemente fue descrito como un nuevo complejo (Castellá y Cabañes, 2014); no obstante, Summerell y Leslie (2006) mencionan como *F. equiseti* var *bullatum* dentro de una misma especie.

Conclusiones

La distinción de especies dentro del género *Fusarium* utilizando caracteres morfológicos fue poco precisa.

El uso de iniciadores específicos empleados para la identificación de especies de *Fusaria* con fines de conocer, de primera mano, la incidencia de cada especie detectada arrojó resultados coincidentes con la secuenciación de las especies: *F. verticilloides*, *F. subglutinans* y *F. oxysporum*.

Con el empleo de los iniciadores TEF, fue posible confirmar la identidad y presencia de siete especies de *Fusaria* aislados en el maíz: *F. verticilloides*, *F. subglutinans*, *F. oxysporum*, *F. equiseti*, *F. nygamai*, *F. andiyazi* y *F. cf. bullatum*.

F. verticilloides fue la especie predominante con un 60.34%, *F. oxysporum* fue la especie que ocupó el segundo lugar, con una incidencia de 30.17%, *F. subglutinans* y *F. cf. bullatum* en tercer lugar con una incidencia de 2.59%.

De acuerdo con nuestros resultados, la estrecha relación filogenética entre las especies *F. verticillioides* y *F. andiyazi* coincidieron con el mating population A descrito por Summerell y Leslie (2006), así como *F. oxysporum*, *F. nygamai* y *F. subglutinans*, dentro del mating population G y para el caso de *F. equiseti* y *F. cf. bullatum* que formaron un grupo separado, se asociaron a un nuevo complejo descrito por Castellá y Cabañes, (2014).

Esta investigación reporta por primera vez la presencia en México a *Fusarium cf. bullatum* causando daños en el maíz.

Literatura citada

- Anderson, E. 1946. Maize in Mexico. A preliminary survey. *Annals of Missouri Botanical Garden*. 33(2):147-247.
- Bacon, C. W.; Hinton, D. M. and Richardson, M. D. 1994. A corn seedling assay for resistance to *Fusarium moniliforme*. *Plant Dis*. 78(3):302-305.
- Bertechini, F. C.; Lumi, A. C. A.; da Silva, C. N.; Tessmannand, D. J. and Barbosa, T. I. P. 2012. New PCR Assays for the Identification of *Fusarium verticillioides*, *Fusarium subglutinans*, and other species of the *Gibberella fujikuroi* Complex. *Int. J. Mol. Sci*. 13:115-132.
- Briones-Reyes, D.; Castillo-González, F.; Chávez-Servia, J. L.; Aguilar- Rincón V. H.; García-de Alba, C. L. y Ramírez-Hernández, A. 2015. Respuesta del maíz nativo del altiplano mexicano a pudrición de mazorca, bajo infección natural. *Agron. Mesoam*. 26(1):73-85.
- Campos-Macías, P.; Arenas-Guzmán, R. and Hernández-Hernández, F. 2013. *Fusarium subglutinans*: a new eumycetoma agents. *Medical Mycology Case Reports*. 2:128-131.

- Castellá, G. and Cabañes, F. J. 2014. Phylogenetic diversity of *Fusarium incarnatum equiseti* species complex isolated from Spanish wheat. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 106(2):309-317.
- Ceecam. 2012. Centro de estudios para el cambio en el campo mexicano. La determinación de los centros de origen y diversidad genética del maíz. Análisis crítico de la propuesta oficial. <http://mapserverceecam.org/tfc/Documentos/CODGM.pdf>.
- De Souza, M.; Matsuzawa, T.; Lyra, L.; Busso-Lopes, A. F.; Gonoï, T.; Zaninle-Schreiber A.; Kamei, K.; Moretti, M. L. and Trabasso, P. 2014. *Fusarium napiforme* systemic infection: case report with molecular characterization and antifungal susceptibility tests. *Springer Plus*. 30(3):492.
- Eckard, S.; Wettstein, F. E.; Forrer, H. R. and Vogelgsang, S. 2011. Incidence of *Fusarium* species and mycotoxins in silage maize. *Toxins*. 3:949-967.
- Espinosa, A.; Tadeo, M.; Turrent, N.; Gómez, N.; Sierra, M.; Caballero, F.; Palafox, A. y Rodríguez, A. 2008. El potencial de las variedades nativas y mejoradas de maíz. *Ciencias*. 92-93:118-125.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. 39(4):783-791.
- Figueroa-Rivera, M. G.; Rodríguez-Guerra, R.; Guerrero-Aguilar, B. Z.; González-Chavira, M. M.; Pons-Hernández, J. L.; Jiménez-Bremont, J. F.; Ramírez-Pimentel, J. G.; Andrio-Enríquez, E. y Mendoza-Elos, M. 2010. Caracterización de especies de *Fusarium* asociadas a la pudrición de raíz de maíz en Guanajuato, México. *Rev. Mex. Fitopatol*. 28(2):124-134.
- García-Aguirre, G. y Martínez-Flores, R. 2010. Especies de *Fusarium* en granos de maíz recién cosechado y desgranado en el campo en la región de Ciudad Serdán, Puebla. *Rev. Mex. Biod*. 81(1):15-20.
- Geiser, D. M.; Jiménez, G. M. M.; Kang, S.; Makalowska, I.; Veeraraghavan, N.; Ward, T. J.; Zhang, N.; Kulda, G. A. and O'Donnell, K. 2004. *Fusarium-ID* v.1.0: a DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *Eur. J. Plant Pathol*. 110:473-479.
- Gimeno, A. y Martins, M. L. 2011. Micotoxinas y micotoxicosis en animales y humanos. 3ª (Ed.). Special nutrients Inc. Miami, FL, USA. 128 p.
- Goodman, M. M. and Bird, R. McK. 1977. The races of maize IV: tentative grouping of 219 Latin American races. *Econ. Bot*. 31(2):204-221.
- Hernández-Juárez, A.; Aguirre-Urbe, L. A.; Flores-Dávila, M.; Cerna-Chávez, E.; Landeros-Flores, J.; Ochoa-Fuentes, Y. M. y Frías-Treviño, G. A. 2016. Incidencia y severidad de pudrición de mazorcas de maíz genéticamente modificado y convencional en Sinaloa, México. *Rev. Mex. Cienc. Agríc*. 7(6):1477-1484.
- Hernández, X. E. y Flores G. A. 1970. Estudio morfológico de cinco nuevas razas de maíz de la Sierra Madre Occidental de México: implicaciones filogenéticas y fitogeográficas. *Agrociencia*. 5(1):3-30.
- Hsuan, H. M.; Zakaria, L. and Salleh, B. 2010. Characterization of *Fusarium* isolates from rice, sugarcane and maize using RFLP-IGS. *J. Plant Protect. Res*. 50(4):409-415.
- Kaur, H.; Mohan, C.; Vikal, Y. and Singh, M. 2014. Pathogenic and molecular characterization of *Fusarium moniliforme* Sheld, the incitant of *Fusarium* maize stalk rot in the Punjab State of India. *Maydica*. 59(3):290-297.
- Leslie, J. F. and Summerell, B. A. 2006. The fusarium laboratory manual. Ames, Iowa, USA. Blackwell Publishing. 388 p.

- Leyva-Madrigal, K. Y.; Larralde-Corona, C. P.; Apodaca-Sánchez, M. A.; Quiroz-Figueroa, F. R.; Mexia-Bolaños, P. A.; Portillo-Valenzuela S.; Ordaz-Ochoa J.; Maldonado-Mendoza I. E. 2015. *Fusarium* species from the *Fusarium fujikuroi* species complex involved in mixed infections of maize in Northern Sinaloa, Mexico. J. Phytopathol. 163(6):1-15.
- Leyva-Madrigal, K. Y.; Larralde-Corona, C. P.; Calderón-Vázquez, C. L. and Maldonado-Mendoza, I. E. 2014. Genome distribution and validation of novel microsatellite markers of *Fusarium verticillioides* and their transferability to other *Fusarium* species. J. Microbiol. Methods. 101:18-23.
- Lin, Z.; Xu, S.; Que, Y.; Wang, J.; Comstock, J. C.; Wei, J.; McCord, P. H.; Chen, B.; Chen, R. and Zhang, M. 2014. Species specific detection and identification of *Fusarium* species complex, the causal agent of sugarcane Pokkah Boeng in China. PLoS ONE. 9(8):1-14.
- López-Valenzuela, B. E.; Armenta, B. A. D.; Apodaca, S. M. A.; Ruelas, J. R.; Palacios-Mondaca, C. A. y Valenzuela E. F. 2014. Reducción de la fertilización sintética con composta y optimización del riego sobre la pudrición del tallo (*Fusarium* spp.) del maíz. Sci. Agrop. 5(3):121-133.
- Madania, A. M.; Altawil, W.; Naffaa, V. H. P. and Hawat, M. 2013. Morphological and molecular characterization of *Fusarium* isolated from maize in Siria. J. Phytopathol. 161(7):452-458.
- Mesterházy, A.; Lemmens, M. and Reid, L. M. 2012. Breeding for resistance to ear rots caused by *Fusarium* spp. in maize-a review. Plant Breed. 131(1):1-19.
- Mishra, P. K.; Fox, R. T. V. and Culham, A. 2003. Development of a PCR-based assay for rapid and reliable identification of pathogenic Fusaria. FEMS Microbiology Letters. 218(2):329-332.
- Morales-Rodríguez I.; Yañez-Morales, M. J.; Silva-Rojas, H. V.; García-de Los Santos, G., and Guzmán-de Peña, D. A. 2007. Biodiversity of *Fusarium* species in Mexico with ear rot in maize, and their identification using a phylogenetic approach. Mycopathologia. 163(1):31-39.
- Mulé, G.; Susca, A.; Stea, G. and Moretti, A. 2004. A species-specific PCR assay based on the calmodulin partial gene for identification of *F. verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. subglutinans*. Eur. J. Plant Pathol. 110(5-6):495-502.
- Navas-Cortés, J. A.; Landa, B. B.; Méndez-Rodríguez, M. A. and Jiménez-Díaz, R. M. 2007. Quantitative modeling of the effects of temperature and inoculum density of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* races 0 and 5 on development of Fusarium wilt in chickpea cultivars. Phytopathology. 97:564-573.
- Nei, M. and Kumar, S. 2000. Molecular evolution and phylogenetics. Oxford University Press, New York, USA. 352 p.
- O'Donnell, K.; Kistler, H. C.; Cigelink, E. and Ploetz, R. C. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 95(5):2044-2049.
- Rahjoo, V.; Zad, J.; Javan, N. M.; Mirzadi, G. A.; Okhovvat, S. M. and Bihamta, M. R. 2008. Morphological and molecular identification of *Fusarium* isolated from maize ears. Iran J. Plant Pathol. 90(3):463-46.
- Rivas, V. P.; Virgen, V. J.; Rojas, M. I.; Cano, S. V. y Ayala, E. V. 2011. Evaluación de la pudrición de mazorca de híbridos de maíz en Valles Altos. Rev. Mex. de Cien. Agríc. 2(6):845-854.
- Sánchez, J. J.; Goodman, M. M. and Stuber, C. W. 2000. Isozymatic and morphological diversity in the Races of maize of México. Econ. Bot. 54(1):43-59.
- Sanger, F.; Nicklen, S. and Coulson, R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 74(12):5463-5467.

- Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipski A. and Kumar, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30(12):2725-2729.
- Tezcan, G.; Ozhak-Baysan, B.; Alastruey-Izquierdo, A.; Ogunc, D.; Ongut, G.; Yildiran S. T.; Hazar, V.; Cuenca-Estrella. M. and Rodríguez-Tudela, J. L. 2009. Disseminated fusariosis caused by *Fusarium verticillioides* in an acute lymphoblastic leukemia patient after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J. Clin. Microbiol.* 47(1):278-281.
- Trapero-Casas, A. and Jiménez-Díaz, R. M. 1985. Fungal wilt and root rot diseases of chickpea in southern Spain. *Phytopathology.* 75:1146-1151.
- Velarde-Félix, S.; Ortega-Murrieta, P. F.; Fierros-Leyva, G. A.; Padilla-Valenzuela, I.; Gutiérrez-Pérez, E.; Rodríguez-Cota, F. G.; López-Valenzuela, J. A.; Acosta-Gallegos, J. A. y Garzón-Tiznado, J. A. 2015. Identificación molecular y biológica de las razas 0 y 5 de *Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr f. sp. *ciceris* (Padwick) Matuo & K. Sato del garbanzo en el Noroeste de México. *Rev. Mex. Cien. Agríc.* 6(4):735-748.
- Zhang, H.; Luo, W.; Pan, Y.; Xu, J.; Xu, J. S.; Chen, W. Q. and Feng, J. 2014. First report of *Fusarium* ear rot of maize caused by *Fusarium andiyazi* in China. *Plant Dis.* 98(10):1428.