

Identificación de especies de *Fusarium* en semilla de ajo en Aguascalientes, México

Yisa Maria Ochoa Fuentes¹, Ernesto Cerna Chávez¹, Gabriel Gallegos Morales¹
Jeronimo Landeros Flores¹, Juan Carlos Delgado Ortiz¹, Sandra Hernández Camacho²
Raúl Rodríguez Guerra³, Víctor Olalde Portugal⁴

¹ Departamento de Parasitología, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila, México. ² Centro de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Jesús María, Aguascalientes, México. ³ Campo Experimental General Terán, INIFAP, General Terán, Nuevo León, México. ⁴ CINVESTAV, Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato, Irapuato, Guanajuato, México

Identification of *Fusarium* species in garlic seed from Aguascalientes, Mexico

Abstract. Garlic in Mexico is one of the most profitable crops and has a number of plant health problems, among which are those caused by fungi. The genus *Fusarium* has shown greater presence for the past eight years, and has been associated with new symptoms in the garlic cultivars of Aguascalientes and Zacatecas region, called basal rot. Given the importance of this disease in the garlic producing area, we raised the need to identify *Fusarium* species involved in this disease morphologically and molecularly. With these methods, we identified four species, namely *Fusarium verticilloides*, *F. acuminatum*, *F. solani* and *F. oxysporum*.

Keywords: morphological identification, molecular identification, basal rot

Resumen. El ajo en México es uno de los cultivos más rentables y presenta una serie de problemas fitosanitarios entre los que destacan los ocasionados por hongos. El género *Fusarium*, ha mostrado mayor presencia durante los últimos ocho años, y se le ha asociado con la nueva sintomatología en los cultivares de ajo de la región de Aguascalientes y Zacatecas, denominada pudrición basal. Dada la importancia de esta enfermedad en la zona productora de ajo, se planteó identificar morfológica y molecularmente las especies de *Fusarium* involucradas en esta enfermedad. Bajo estos métodos se identificaron cuatro especies a saber: *Fusarium verticilloides*, *F. acuminatum*, *F. solani* y *F. oxysporum*.

Palabras clave: identificación morfológica, identificación molecular, pudrición basal

Received 2 January 2012; accepted 14 November 2012.

Recibido 2 de enero 2012; aceptado 14 de noviembre de 2012.

Introducción

En México, el ajo es considerado uno de los cultivos más rentables, con una superficie sembrada de 5 654 ha (FAO, 2009) y una producción nacional reportada para el 2009 de 56 088 ton. Los Estados que concentran el 87% de la producción son: Zacatecas, Guanajuato, Baja California, Aguascalientes y Sonora. Aguascalientes en el 2009 contribuyó con una área cosechada de 314 ha y una producción de 3 981 ton con valor de 33 539 000 pesos (INEGI, 2010). Las plantas de ajo son agámicas, careciendo generalmente de semillas viables, por lo que la única vía de propagación es mediante los bulbillos o

*Autor para correspondencia: Yisa Ochoa
yisa8a@yahoo.com*

dientes, por lo que en los ciclos sucesivos del cultivo producen una acumulación de problemas fitosanitarios como son: nemátodos, bacterias, virus y hongos (INTA, 1993). Dentro de los hongos fitopatógenos del ajo podemos destacar a *Fusarium* spp. que ataca al cultivo desde su estado de plántula (Quiroz *et al.*, 2008); éste ha mostrado mayor presencia durante los últimos ocho años, como lo mencionan Velásquez y Medina (2004), en donde encontraron a *Fusarium* spp. como hongos causantes de la nueva sintomatología presente en los cultivares de ajo de la región de Aguascalientes y Zacatecas, denominada pudrición basal. La pudrición basal ocasionada por *Fusarium* spp. se ha convertido en una limitante en diversas zonas productoras de

cebolla y ajo no sólo en México, también en países como Argentina que es el cuarto productor de ajo a nivel mundial (Kiehr y Delhey, 2005). Las especies de *Fusarium* presentan una amplia variedad de hospederos, produciendo en aliáceas daños en almácigos de cebolla con el damping-off, además de afectar al ajo en almacén. Entre los hongos de suelo que provocan enfermedades en el cultivo de cebolla y ajo se encuentran diversas especies de *Fusarium*, ampliamente distribuido a nivel mundial, que ocasionan la producción basal del bulbo de cebolla (*Fusarium oxysporum* f. s.p. *cepae*) y del ajo (*Fusarium culmorum*). Los daños causados por este género pueden alcanzar el 40% de reducción de rendimientos (Schwartz y Mohan, 1995). Recientemente *Fusarium proliferatum* se encontró afectando a la cebolla (Stankovic *et al.*, 2007) y ajo (Dugan *et al.*, 2003), sin embargo, *F. oxysporum* fue el más común causante de la pudrición basal del ajo. Aunque se han logrado avances en la identificación de muchos hongos, aún existen dificultades para el adecuado reconocimiento de ciertos géneros y especies de este grupo de organismos. La identificación basada en la morfología presenta en ocasiones un importante grado de dificultad, sobre todo para distinguir especies cercanas, con características fenotípicas muy similares. La identificación por métodos moleculares es una opción para confirmar las identidad de estos hongos y resolver dudas sobre la taxonomía de los mismos (Unda *et al.*, 2011; Chandra *et al.*, 2011). Por lo anterior se planteó como objetivo aislar e identificar morfológica y molecularmente las especies de *Fusarium* encontradas en semillas de ajo del estado de Aguascalientes, México.

Materiales y métodos

Muestreo

Se realizaron muestreos en 10 parcelas de ajo del estado de

Aguascalientes, durante los meses Abril-Septiembre de 2010.

Aislamiento del hongo de bulbos

El aislamiento consistió en limpiar el tejido vegetal enfermo (bulbos) con un algodón embebido en alcohol al 70%, se realizaron pequeños cortes de la zona de avance de la infección, donde el patógeno se encontraba en activo desarrollo. Los trozos fueron desinfectados con una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 3 minutos, enjuagados con agua destilada estéril y sembrados en cajas de Petri con medio PDA, adicionado con estreptomycin (100 ppm). Las placas fueron incubadas a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ por 7 días, posteriormente a partir de los trozos sembrados se observó el micelio del hongo. En función de los tipos y coloraciones de micelio desarrollados fue el número de explantes que se realizaron, esto con la finalidad de obtener un cultivo puro. El explante consistió en extraer del borde de la colonia un trozo de agar con micelio, sembrarlo en otra placa de Petri conteniendo medio PDA, e incubarlo a $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ durante el tiempo transcurrido para la formación de las estructuras reproductivas necesarias para la identificación del hongo.

Identificación de género

A los siete días se realizaron preparaciones tomando porciones de micelio con esporas; las cuales se observaron al microscopio y fueron identificados con base en la clave de Barnett y Hunter (1998).

Obtención de cepas monoconidiales

A partir de colonias de *Fusarium* en cultivo en PDA, se obtuvo una suspensión de conidios que fue dispersada en placas con el mismo medio. A las 24 h cuatro conidios germinados fueron transferidos a PDA. Se conservaron colonias morfológicamente diferentes que se desarrollaron a partir de los conidios transferidos provenientes de la placa original. Las colonias monoconidiales fueron transferidas al

medio de cultivo Spezieller Nährstoffmarmar Agar (SNA; 1.0 g de KH_2PO_4 , 1.0 g de KNO_3 , 0.5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g de KCl , 0.2 g de glucosa, 0.2 g de sacarosa y 20.0 g de agar en un litro de agua destilada) y ahí fueron mantenidas para su conservación y uso posterior. A partir de estas colonias se llevó a cabo la identificación de especies.

Identificación de especies

A partir de los cultivos monoconidiales se tomó un pequeño fragmento de la colonia y se transfirió al centro de cajas Petri conteniendo PDA y SNA. Las placas inoculadas se mantuvieron a 26 °C por 15 días. A los diez días se midió el diámetro de las colonias en PDA y a los 15 días en las placas de SNA inoculadas. Se observaron las características microscópicas de las colonias. El análisis microscópico se realizó en un microscopio Leica (ATC 2000) con aumentos de 60X, 150X y 600X. La identificación se basó principalmente en la estructura, composición y ultraestructura de las células conidiales, conidióforos y clamidosporas, para ello se usaron las claves de Domsch *et al.* (1980); Nelson *et al.* (1983) y de Leslie y Summerell (2006).

Identificación molecular

La extracción de ADN se realizó mediante el método de Doyle y Doyle (1990). El producto de la extracción se visualizó en un gel de agarosa al 1% mediante electroforesis. Posteriormente se amplificó mediante el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) las regiones internas transcritas ITS1 e ITS4 entre los genes ribosomales (rDNA) 18S-5.8S y 5.8S-28S utilizando el par de iniciadores de secuencia ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG)/ ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) colocando en cada muestra buffer de enzima a 1x, 1 μL ; dNTP's a 0.2 mM, 1 μL ; MgCl a 2 mM, 0.4 μL ; ITS1 a 1 pM, 0.5 μL ; ITS4 a 1 pM, 0.5 μL ; 0.5 UDO de Taq polimerasa, 0.1 μL ; DNA problema ajustado a 50 ng, 1 μL ; y 5.5 μL de agua ultrapura estéril para ajustar un

volumen final de 10 μL . Las condiciones de la reacción de PCR fueron: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C por 5min, 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 10 segundos, 30 ciclos de alineamiento a 57 °C por 30 segundos, 30 ciclos de extensión a 72 °C por 2 min. y 1 ciclo de extensión final a 72 °C por 5 min. La amplificación se visualizó en un gel de agarosa al 1% mediante electroforesis. El producto de PCR se purificó con el kit de purificación de bandas de In vitro gen (PureLink® Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit), y se secuenció en dos direcciones (5' a 3' y 3' a 5') con un secuenciador automático. Los pares de base obtenidos se compararon con las secuencias reportadas en la base de datos del banco de genes del NCBI (National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nih.gov) mediante el programa BLAST.

Resultados y discusión

De las muestras obtenidas se lograron identificar morfológicamente cuatro especies de *Fusarium*, las cuales fueron: *Fusarium verticilloides* (Saccardo) Nirenberg la cual presentó cadenas largas de microconidios, monofialides y macroconidios abundantes, de tamaño corto relativamente delgados con paredes delgadas casi rectos o ligeramente curvados, célula apical curvada y célula basal en forma de pie. *Fusarium acuminatum* Ellis & Everhart mostró micelio de color rosa con pigmentaciones rojas, macroconidios de pared gruesa y curvatura dorsiventral moderada, célula apical en forma de cono es decir estrecha y alargada, presentó cinco septos y su célula basal no es tan prominente como la de otras especies estrechamente relacionadas a ella, como es el caso de *F. equiseti* (Corda) Saccardo. *Fusarium solani*, (Martius) Appel & Wollenweber emend. Snyder & Hansen presentó micelio de color crema a beige, los conidios se agruparon en falsas cabezas, presentó fialides largas, microconidios de

forma oval a elíptica siendo éstos mono y bicelulares con pared gruesa y las macroconidias presentaron células apical y basal redondeadas de 3 a 5 septos. *Fusarium oxysporum* Schlechtendahl emend. Snyder & Hansen, produjo micelio aéreo algodonoso de color blanco a violeta claro, microconidias abundantes unicelulares y bicelulares de forma ovoide a elipsoide, formadas en falsas cabezas, monofialides cortas y macroconidias pequeñas en forma de canoa con una corta célula apical y ligeramente curvada y célula basal trunca, con 3 a 5 septos. Así mismo se corroboró la identidad de las mismas mediante la técnica ITS - PCR en donde los productos amplificados fueron de 500 pb aproximadamente, se observó que se presentaron ligeras diferencias en el peso molecular de las bandas, dependiendo de la especie analizada, *Fusarium oxysporum* mostró un peso ligeramente mayor de aproximadamente 600 pb y *F. solani*, fue la más pequeña respecto a su peso molecular. Las dos direcciones secuenciadas por muestra tuvieron un 100% de similitud entre nucleótidos (Tabla 1). Al comparar la secuencia de nucleótidos de cada aislamiento identificado morfológicamente en este trabajo con las reportadas en el banco de genes del National Center for Biotechnology Information (NCBI), éstas correspondieron a la misma especie, con el más alto valor de identidad, con lo cual se

corroboró la identidad morfológica de las especies aisladas. Otros autores (Moreno *et al.*, 2005; Pérez *et al.*, 2005; Magos *et al.*, 2010) también han recurrido a este último método para identificar o corroborar la identificación morfológica de distintos géneros y especies de hongos, como *Fusarium*, en plantas o semillas taxonómicamente distintas.

Las especies de hongos: *F. verticillioides*, *F. solani*, *F. acuminatum* y *F. oxysporum* han sido reportadas con anterioridad como patógenos de otras plantas de la subespecie Allioideae, como *Allium fistulosum* o *Allium cepa* y *Allium sativum*, en países como Japón y Serbia (Stankovic *et al.*, 2007; KloKoãar *et al.*, 2008; Chandrika *et al.*, 2009). En *A. sativum*, se ha reportado frecuentemente la presencia de *F. oxysporum* y *F. solani* como causantes de la pudrición basal del ajo (Jiménez *et al.*, 2009). *F. oxysporum*, ha sido considerado como el agente causal de la pudrición basal de la cebolla, el cuál predominó en el estudio de Dissanayake *et al.* (2009), en donde se encontró que *F. solani* y *F. verticillioides* colonizaban plantas de cebolla, estas especies no habían sido reportadas como patógenos de cebolla o alguna otra *Allium* spp. en Japón. Sin embargo, *F. verticillioides* puede ocasionar severas pudriciones en maíz (Oren *et al.*, 2003), por lo que estos resultados concuerdan con los mostrados en la presente investigación, ya que se encontró a *F. oxysporum*, *F. solani* y

Tabla 1. Caracterización molecular por alineamiento de las secuencias reportadas en el banco de genes con las secuencias intergénicas (ITS¹) de los genes rDNA de las especies de *Fusarium* aisladas de semillas de ajo

Nombre de la muestra ²	Especie identificada	Número de nucleótidos ³	Número de acceso ⁴	I S ⁵
Y-9	<i>F. oxysporum</i>	461	HQ658967	100%
Y-7	<i>F. solani</i>	387	HQ829354	100%
Y-10	<i>F. acuminatum</i>	283	FR872730	100%
Y-15	<i>F. verticillioides</i>	614	HQ379695	100%
Y-26	<i>F. verticillioides</i>	462	HQ654893	100%

¹ Internal transcribed spacer (siglas en inglés). ² Nombre otorgado a las cepas analizadas por localidad de recolecta. ³ Número de nucleótidos amplificados por PCR: ITS con los iniciadores ITS1-ITS4. ⁴ Base de datos del NCBI (National Center of Biotechnology Information)

⁵ Índice de similitud entre las secuencias de las especies aisladas y las especies comparadas.

F. verticilloides en semilla de ajo. En Aguascalientes se ha reportado a *Fusarium* spp. como causante de la enfermedad conocida como pudrición basal del ajo (Velásquez y Medina, 2004). Stankovic *et al.* (2007) citaron *F. acuminatum* en ajo y cebolla en Serbia, sin embargo, este fitopatógeno es común en cereales (Strausbaugh *et al.*, 2005). Cabe destacar que la presencia de esta especie en nuestra investigación, probablemente se debe a que estos terrenos se dedicaban anteriormente a la siembra de diversos cereales.

Literatura citada

- Barnett, H. L., B.B. Hunter, 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. APS Press, Minnesota.
- Chandra, N.S., E.G. Wulff, A.C. Udayashankar, B.P. Nandini, S.R. Niranjana, C.N. Mortensen, H.S. Prakash, 2011. Prospect of molecular markers in *Fusarium* species diversity. Applied Microbiology and Biotechnology 90:1625-1639.
- Chandrika, D. M. L. M., R. Kashima, S. Tanaka, S. Ito, 2009. Pathogenic variation and molecular characterization of *Fusarium* species isolated from wilted Welsh onion in Japan. Journal of General Plant Pathology 75: 37-45.
- Dissanayake, M.L.M.C., R. Kashima, S. Tanaka, R. Ito, 2009. Pathogenic variation and molecular characterization of *Fusarium* species isolated from wilted Welsh onion in Japan. Journal of General Plant Pathology 75: 37-45.
- Domsch, K. H., W. Gams, H. Anderson, 1980. Compendium of soil fungi Vol. 1. Academic Press- London -UK, New York.
- Doyle, J. J., J. L. Doyle, 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12:13-15.
- Dugan, F.M., B.C. Hellier, S.L. Lupien, 2003. First report of *Fusarium proliferatum* causing rot of garlic bulbs in North America. Plant Pathology 52: 426.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2009. Production garlic 2009 data. Statistics Division, FAOSTAT.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía), 2010. Anuario estadístico de Aguascalientes 2010.
- INTA (Instituto nacional de tecnología agropecuaria), Burba, J. L. (Ed.), 1993. Manual de producción de semillas hortícolas: ajo. Fascículo 5.
- Jiménez, M. A., D. Ulacio, W. Perdomo, E. Briceño, 2009. Micobiota y nematodos asociados con la rizósfera y raíz en el cultivo de ajo (*Allium sativum* L.). Bioagro 3: 209-216.
- Kiehr, M., R. Delhey, 2005. *Fusarium oxysporum* y *F. proliferatum* como causa de podredumbre basal y muerte de plántulas de cebolla, en el sur argentino. XII Congreso Latinoamericano- XXVIII Congreso Argentino de Horticultura, Argentina pp. Hv13.
- KloKoár, S. Z., J. T. Leviä, S. N. Mašireviä, V. J. M. Grozdanoviä, M. A. Vasiä, S. R. Aleksiä, 2008. *Fusarium* rot of onion and possible use of Bioproduct. Matica Srpska Proceedings for Natural Sciences 114: 135-148.
- Leslie, J. F., B. A. Summerell, 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing, USA.
- Magos, G. K., M. S. G. Leyva, A. L. A. Mariscal, 2010. Etiología de la pudrición de bulbo y tallo de la azucena híbrida (*Lilium* spp.) y su Control en el Estado de México. Revista Mexicana de Fitopatología 28: 162-164.
- Moreno, V. M., M. M. J. Yañez, M. R. I. Rojas, M. E. Zavaleta, S. A. Trinidad, 2005. Diversidad de hongos en semillas de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.) y su caracterización molecular. Revista Mexicana de Fitopatología 23: 111-118.
- Nelson, P., T. Toussoun, W. Marasas, 1983. *Fusarium* species, an illustrated manual for identification. Universidad de Pensilvania.
- Oren, L., S. Ezrati, D. Cohen, A. Sharon, 2003. Early events in the *Fusarium verticilloides* maize interaction characterize by using a green fluorescent protein expressing transgenic isolate. Applied and Environmental Microbiology 69: 1695-1701.
- Pérez, V. O. A., M. M. J. Yañez, R. D. Alvarado, T. D. Cibrian, D. S. E. García, 2005. Hongos asociados a eucalipto. Agrociencia 39: 311-318.
- Quiroz, S. V. F., C. R. Ferrera, A. Alarcón, H. M. E. Lara, 2008. Antagonismo *in vitro* de cepas de *Aspergillus* y *Trichoderma* hacia hongos filamentosos que afectan al cultivo del ajo. Revista Mexicana de Micología 26: 27-34.
- Rabie, C. J., E. S. Sydenham, P. G. Thiel, A. Lubben, y W. F. Marasas, 1986. T-2 toxin production by *Fusarium acuminatum* isolated from oats and barley. Applied and Environmental Microbiology 52: 594-596.
- Schwartz, H. F., K. Mohan, 1995. Compendium of onion and garlic diseases. Academic Press. San Diego California. 54 p.
- Stankovic, S., J. Levic, T. Petrovic, A. Logrieco, A. Moretti, 2007. Pathogenicity and mycotoxin production by *Fusarium proliferatum* isolated from onion and garlic in Serbia. European Journal of Plant Pathology 118:165-172.
- Strausbaugh, C. A., O. Overturf, A. C. Koehn, 2005. Pathogenicity and real-time PCR detection of *Fusarium* spp. in wheat and barley roots. Canadian Journal of Plant Pathology 27: 430-438.
- Unda, F., J. M. Agüero, M. C. Fariñas, M. L. Martínez, 2011. Identificación de hongos de importancia clínica mediante técnicas moleculares. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 29: 282-285.
- Velásquez V. R., A. M. M. Medina, 2004. Guía para conocer y manejar las enfermedades más comunes de la raíz del ajo en Aguascalientes y Zacatecas. Folleto para productores No. 34. INIFAP y Centro de investigación regional norte-centro campo experimental pabellón.

