



"Enseñar la Explotación
de la Tierra. no la del

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

INSTITUTO DE HORTICULTURA

**ESTRATEGIAS PARA EL ESTUDIO DE *Fusarium oxysporum*
PRESENTE EN EL BAJÍO: RAZAS PATOGENICAS,
PATOGENICIDAD Y FILOGENIA**

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

PRESENTA

CARMEN MEDINA MENDOZA

Chapingo, México, junio de 2016



DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES



**ESTRATEGIAS PARA EL ESTUDIO DE *Fusarium oxysporum* PRESENTE EN EL
BAJÍO: RAZAS PATOGÉNICAS, PATOGENICIDAD Y FILOGENIA**

Tesis realizada por la C. **Carmen Medina Mendoza** bajo la dirección del Comité Asesor
indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

DIRECTOR:



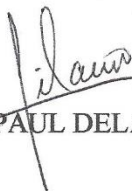
DRA. ERNESTINA VALADEZ MOCTEZUMA

ASESOR:



DR. MARIO PÉREZ GRAJALES

ASESOR:



DR. JOHN PAUL DELANO FRIER

LECTOR EXTERNO:



DRA. OLGA GÓMEZ RODRÍGUEZ

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por el financiamiento otorgado para la realización de los estudios de Doctorado en Ciencias.

A la Universidad Autónoma Chapingo por darme la oportunidad de lograr mis metas.

A todos mis profesores del posgrado en Horticultura por ser parte de mi formación académica.

A la Dra. Ernestina Valadez Moctezuma, por sus consejos, amistad y apoyo durante la elaboración de la fase experimental y elaboración de la tesis.

Al Dr. Mario Pérez Grajales por su apoyo brindado durante la fase experimental de la tesis y revisión de la misma.

Al Dr. John Paul Delano Frier por su contribución en la revisión de la tesis.

A la Dra. Olga Gómez Rodríguez por sus valiosas sugerencias para mejorar la tesis

A mis compañeros de posgrado en Horticultura generación 2012-2015 por compartir gratos momentos.

A mi familia por todo el apoyo brindado.

DATOS BIOGRÁFICOS

El autor de la presente es originaria del estado de Hidalgo. Nació el 30 de julio del 1983. Realice mis estudios en la Preparatoria Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo en la generación 1998-2001. Realice mis estudios de licenciatura (2001-2005) en el Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, obteniendo el título de Ingeniero Agrónomo Especialista en Fitotecnia con la tesis titulada “Evaluación de Medios de Cultivo *In Vitro* para la germinación de semillas de *Laelia anceps*”. Realice una maestría en el Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, en el Programa de Biotecnología Agrícola (2006-2007) obteniendo el título de Maestra en Ciencias en Biotecnología Agrícola con la tesis titulada “Crioconservación Mediante Encapsulación-Deshidratación y Vitricación, y Caracterización molecular de *Laelia speciosa*”. Durante 2012-2015 cumplí con los créditos e investigación correspondiente para el Doctorado en Ciencias en Horticultura en el Instituto de Horticultura del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo con la tesis titulada “Estrategias para el estudio de *Fusarium oxysporum* presente en el Bajío: razas patogénicas, patogenicidad y filogenia”.

ESTRATEGIAS PARA EL ESTUDIO DE *Fusarium oxysporum* PRESENTE EN EL BAJÍO: RAZAS PATOGENICAS, PATOGENICIDAD Y FILOGENIA

STRATEGIES FOR STUDYING *Fusarium oxysporum* PRESENT IN THE BAJIO: PATHOGENIC RACES, PATHOGENICITY AND PHYLOGENY

Carmen Medina Mendoza¹, Ernestina Valadez Moctezuma²

RESUMEN

El complejo de especies de *Fusarium oxysporum* son patógenos del suelo, responsables de la enfermedad de marchitez vascular en un amplio rango de cultivos. Representa el grupo más importante de hongos fitopatógenos, limitando la producción de alimentos. En el presente trabajo se estudiaron cepas de *Fusarium oxysporum* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* provenientes de plantas de garbanzo con síntomas de marchitez y amarillamiento (fusariosis) de la región del Bajío. En primer lugar, se pretendió conocer la raza a la que pudieran pertenecer los aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* utilizando marcadores específicos. Debido a que no fue posible ubicarlos en raza alguna, se determinó su relación filogenética a través de la secuenciación de los genes TEF, mtSSU, ITS, IGS rDNA y NIR comparándolos con representantes de las razas 1, 2, 3, 4 y 5 del mismo hongo. En segundo lugar, se definió la relación filogenética de 37 aislamientos de *Fusarium oxysporum* de las mismas plantas, utilizando los genes TEF, ITS y mtSSU. Por otro lado, se seleccionaron representantes del complejo de *Fusarium oxysporum* y se evaluó el daño en diferentes cultivos hortícolas, incluyendo cultivares de chile (*Capsicum annuum* y *Capsicum pubescens*). Los resultados indicaron que los aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* no pertenecieron a ninguna de las razas de este hongo. Sin embargo, presentaron patotipos similares a los causados por éstas en plantas de garbanzo. La comparación de sus genes a nivel secuencia con los de las 5 razas, mostraron alta divergencia, indicando poca relación entre ellos. El análisis filogenético de los 37 aislamientos, permitió identificar que éstos pertenecen a los complejos de *Fusarium oxysporum*, *Gibberella fujikuroi*, *Fusarium incarnatum-equiseti* y *Fusarium solani*. Los aislamientos del complejo de *Fusarium oxysporum* inoculados en los cultivos, mostraron varios tipos de daño, entre ellos marchitez y amarillamiento. Para el caso de *Capsicum annuum*, el cultivar “Piquín” mostró mayor susceptibilidad y el cultivar criollo Morelos CM334 se manifestó como resistente a los aislamientos utilizados. Por lo anterior, *Fusarium oxysporum* puede ser un modelo útil para estudiar los mecanismos de virulencia e identificar las variantes en plantas susceptibles y resistentes. **Palabras clave:** Marchitez vascular, cultivos hortícolas, *Capsicum*, resistencia, susceptibilidad.

ABSTRACT

The *Fusarium oxysporum* species complex consists of soil-borne pathogens responsible for the disease of vascular wilt in a wide range of crops. It represents the most important group of plant pathogenic fungi that limits food production. In the present work *Fusarium oxysporum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* strains from chickpea plants in the Bajío zone with wilting and yellowing symptoms were studied. The first aim was to try to determine the race to which the isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* may belong using specific markers. Because it was not possible to locate them in any race, their phylogenetic relationship was determined by sequencing TEF, mtSSU, ITS, IGS rDNA and NIR genes compared with representatives of races 1, 2, 3, 4 and 5 of the same fungus. Secondly, the phylogenetic relationship of thirty-seven isolates of *Fusarium oxysporum* from the same plants was defined, using the TEF, ITS and mtSSU genes. On the other hand, representatives of the *Fusarium oxysporum* complex were selected and the damage on different vegetable crops, including chili cultivars (*Capsicum annuum* y *Capsicum pubescens*), was evaluated. The results indicated that the isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* do not belong to any of the races for this fungus. However, they presented similar pathotypes to those caused by them in chickpea plants. Comparing their sequence-level genes with those of the five races, they showed high divergence, indicating low relationship between them. Phylogenetic analysis of the 37 isolates determined that they belong to the complex of *Fusarium oxysporum*, *Gibberella fujikuroi*, *Fusarium incarnatum-equiseti* and *Fusarium solani*. The isolates of the *Fusarium oxysporum* complex inoculated in the crops showed several types of damage, including wilting and yellowing. In the case of *Capsicum annuum*, the cultivar “Piquín” showed greater susceptibility to the isolates used, while the local cultivar Morelos CM334 showed resistance. Therefore, *Fusarium oxysporum* can be a useful model to study the virulence mechanisms and identify variants in susceptible and resistant plants.

Keywords: Vascular wilt, horticultural crops, *Capsicum*, resistance, susceptibility.

¹Estudiante de Doctorado. Doctorado en Ciencias en Horticultura. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México-Texcoco Km 38.5, Chapingo, 56230. Texcoco de Mora, Estado de México. E-mail: carmen_medinamendoza@yahoo.com.mx

²Profesora-investigadora. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México-Texcoco Km 38.5, Chapingo, 56230. Texcoco de Mora, Estado de México. E-mail: nestty56@yahoo.com.mx

Contenido

ESTRATEGIAS PARA EL ESTUDIO DE <i>Fusarium oxysporum</i> PRESENTE EN EL BAJÍO: RAZAS PATOGENICAS, PATOGENICIDAD Y FILOGENIA.....	5
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	5
OBJETIVO GENERAL.....	8
OBJETIVOS PARTICULARES.....	8
REFERENCIAS.....	9
Capítulo I: Revisión de literatura	15
1.1 <i>Fusarium oxysporum</i>	15
1.2 La evolución de <i>Fusarium oxysporum</i>	16
1.3 Fusariosis vascular en Garbanzo	16
1.4 Análisis de secuencias de DNA.....	17
1.5 Interacción planta-patógeno	19
1.6 Referencias.....	21
Capítulo II. Comparación genética de razas de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> con aislamientos de plantas de garbanzo en el Bajío, México	26
2.1 Introducción.....	27
2.2 Materiales y métodos	30
2.2.1 Análisis genético de las razas de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> y aislamientos de plantas de garbanzo con fusariosis.....	31
2.3 Resultados y discusión	33
2.3.2 Análisis filogenético de aislamientos del Bajío y razas de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i>	36
2.4 Conclusiones	42
2.5 Literatura citada.....	43
Capítulo III. Relación filogenética de aislados de <i>Fusarium</i> obtenidos de garbanzo (<i>Cicer arietinum</i> L.) de la zona del Bajío, México	50
3.1 Introducción.....	50
3.2 Materiales y métodos	52
3.3 Resultados y discusión	55
3.3.1 Análisis filogenético con TEF.....	55
3.3.2 Análisis filogenético con ITS.....	57
3.3.3 Análisis filogenético con mtSSU	58

3.4 Conclusiones	60
3.5 Literatura citada	61
Capitulo IV. Patogenicidad de representantes del complejo de <i>Fusarium oxysporum</i> en cultivos de importancia económica para México	65
4.1 Introducción	65
4.2 Materiales y métodos	67
4.3 Resultados y discusión	71
4.3.1 Identificación de aislamientos de chile manzano	71
4.3.2 Evaluación del daño de <i>Fusarium</i> cultivos	72
4.4 Conclusión	76
4.5 Literatura citada	77
Capitulo V. Evaluación de la susceptibilidad y tolerancia de <i>Capsicum</i> sp. con representantes del complejo de <i>Fusarium oxysporum</i>	81
5.1 Introducción	82
5.2 Materiales y métodos	83
5.3 Resultados y discusión	86
5.4 Conclusiones	89
5.5 Literatura citada	89
Capitulo VI. Discusión general	92
6.1 Fusariosis en garbanzo en la región del Bajío, México	92
6.2 Filogenia en <i>F. oxysporum</i>	94
6.3 Patogenicidad del complejo de especies de <i>F. oxysporum</i>	96
6.4 Conclusiones	98
6.5 Literatura citada	99

LISTA DE CUADROS

Capítulo II.

Cuadro 1. Aislamientos identificados como <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i>	30
Cuadro 2. Primers utilizados para la identificación de razas y amplificación de genes de <i>Fusarium</i>	32

Capítulo III

Cuadro 1. Aislamientos de <i>Fusarium</i> provenientes de plantas de garbanzo (<i>Cicer arietinum</i>).....	53
---	----

Capítulo IV

Cuadro 1. Aislamientos empleados para la inoculación.....	69
Cuadro 2. Cultivos utilizados para las evaluaciones con <i>Fusarium</i>	70
Cuadro 3. Análisis de Varianza de incidencia y severidad del daño de las cepas del complejo de especies de <i>Fusarium oxysporum</i> en diferentes cultivos hortícolas.....	74

Capítulo V

Cuadro 1. Cultivares de <i>Capsicum</i> spp. utilizados para las evaluaciones con <i>Fusarium</i> ...	85
Cuadro 2. Incidencia y severidad del daño de las cepas del complejo de especies de <i>Fusarium oxysporum</i> en chile (<i>Capsicum</i> spp.).....	88

LISTA DE FIGURAS

Capítulo II.

Figura 1. Análisis electroforético en agarosa 1.2 % de los productos de amplificación por PCR de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i>	35
Figura 2. Amplificación de fragmentos de los genes TEF, mtSSU, ITS, IGS y NIR.....	37
Figura 3. Análisis filogenético de cinco razas de <i>Foc</i> , cuatro aislamientos del Bajío y accesiones del Genbank para los genes TEF, mtSSU, ITS, IGS rDNA y NIR.....	39

Capítulo III

Figura 1. Filograma obtenido del análisis de máxima parsimonia de los haplotipos identificados con las secuencias del gen TEF de los aislados estudiados.....	57
Figura 2. Filograma obtenido del análisis de máxima parsimonia de los haplotipos identificados con las secuencias del gen ITS de los aislados estudiados.....	58
Figura 3. Filograma obtenido del análisis de máxima parsimonia de los haplotipos identificados con las secuencias del gen mtSSU de los aislados estudiados.....	59

Capítulo IV

Figura 1. Tipos de daño ocasionado por <i>Fusarium oxysporum</i> en diferentes cultivos.....	74
--	----

Capítulo V

Figura 1. Daño por <i>Fusarium oxysporum</i> en plántulas de <i>Capsicum</i> spp.....	87
Figura 2. Síntomas de marchitez y amarillamiento en plántulas en los cultivares de <i>Capsicum</i>	87

ESTRATEGIAS PARA EL ESTUDIO DE *Fusarium oxysporum* PRESENTE EN EL BAJÍO: RAZAS PATOGÉNICAS, PATOGENICIDAD Y FILOGENIA

INTRODUCCIÓN GENERAL

El complejo de especies de *Fusarium oxysporum* son patógenos cosmopolitas de plantas del suelo. Más de 150 formas especiales específicos de hospedantes han sido descritos en esta especie y cada uno de ellos consiste de uno o más grupos de compatibilidad vegetativa y de distintas razas patogénicas (Bayeen *et al.*, 2000). El daño que causan estos patógenos es un factor ampliamente limitante para la producción de alimentos (Zhao *et al.*, 2014), debido a que pueden infectar a una amplia variedad de hospedantes y causar varios tipos de enfermedad. Después de la germinación y penetración en la raíz, el hongo entra al sistema vascular de la planta y subsecuentemente se mueve a través de los vasos del xilema y coloniza rápidamente a la planta, lo que lleva a una marchitez generalizada, necrosis y clorosis de la parte aérea durante cualquier etapa de desarrollo de las plantas (Roncero *et al.*, 2003; Smit, 2007; Chandra *et al.*, 2011). Por otro lado, son productores de micotoxinas como: ácido fusarico, licomarasmina, funomisinas y tricotecinas, las cuales ocasionan la muerte y degradación de las células, causando el cierre parcialmente de los estomas, la reducción de la clorofila y detiene la fotosíntesis (Edel-Hermann, 2015). La existencia de un arsenal de factores de virulencia y mecanismos de patogenicidad amplían el rango de hospedantes; sin embargo, los mecanismos de infección no han sido claramente entendidos (Ortoneda *et al.*, 2004).

El estudio de este género ha sido difícil, debido a que cepas con morfología similar muestran diferencias considerables a nivel de DNA, lo cual ha limitado establecer un

sistema taxonómico adecuado (Geiser *et al.*, 2004, Chandra *et al.*, 2011). Recientemente, se han realizado análisis filogenéticos para examinar la taxonomía de especies de *Fusarium* y se ha propuesto un nuevo sistema basado en el concepto de especie filogenética (organismos con características diagnósticas diferentes a las de otros grupos similares y que además exhiben un patrón de ancestro y descendencia) (Watanabe, 2011). O'Donnell *et al.* (1998a, 1998b) estudiaron múltiples genes o porciones de ellos con los que estimaron la relación genética de diferentes especies de *Fusarium*, demostrando que este grupo de hongos patogenicos representa complejos de especies que comprenden una colección de varios linajes clonales. Las metodologías basadas en el análisis de DNA han hecho posible diferenciar entre especies del género *Fusarium* (Nitschke *et al.*, 2009), para lo cual se han diseñado primers específicos para identificar formas especiales y razas de *F. oxysporum*; pero además se han estudiado genes o regiones del genoma para su estudio filogenético (Lievens *et al.*, 2008). Los análisis del gen TEF (factor 1- α de traducción y extensión) y de la subunidad pequeña del ribosoma del RNA mitocondrial (mtSSU) han sido evaluadas en distintas especies ayudando a elucidar la relación evolutiva con varias formas especiales de *F. oxysporum* (O'Donnell *et al.*, 1998; O'Donnell *et al.*, 2000; Baayen *et al.*, 2000; Baayen *et al.*, 2001). Las regiones ITS (sus siglas en inglés; espacio transcrito interno) de los genes del RNA ribosomal también poseen zonas altamente conservadas, que permiten identificar molecularmente a las especies de patógenos con base en las variaciones nucleotídicas (Bao *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2006). Otra zona relacionada es la variación en el espacio intergénico (IGS; sus siglas en inglés) utilizado para resolver relaciones intraespecíficas en *Fusarium*; así como el gen de nitrato reductasa (Skovgaard *et al.*, 2001).

Particularmente, *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (Foc) (Padwick) Matuo & K. Sato es el agente causal de la enfermedad conocida como “fusariosis” (marchitez y amarillamiento) en garbanzo (*Cicer arietinum* L.) limitando su producción a nivel mundial (Jiménez *et al.*, 2004). El daño que ocasiona *Foc* en el cultivo de garbanzo en México afecta la producción del 10 al 60 % (Sosa, 2012). Los patotipos (amarillamiento y marchitez) son causados por ocho razas patogénicas (0, 1A, 1B/C, 2, 3, 4, 5 y 6) basados en la reacción de un set de cultivares diferenciales en garbanzo. Las razas 0 y 1B/C inducen síntomas de amarillamiento, mientras que el resto, causan marchitez (Haware y Nene, 1982). Las razas 2, 3 y 4 fueron reportadas solo en la India, las razas 0, 1B/C, 5 y 6 han sido encontradas en la región del Mediterráneo, Estados Unidos (California) y México (Sonora, Sinaloa, Baja California Sur) (Arvayo *et al.* 2011; Velarde *et al.* 2015), y la raza 1A ha sido reportada en la India, California y en la región del Mediterráneo (Haware y Nene, 1982; Jiménez *et al.*, 2004).

Considerando que *Foc* es un patógeno cosmopolita que ocasiona severos daños a los cultivos, particularmente en México, existe escasa información referente a la presencia de las razas fisiológicas reconocidas de este hongo (Arvayo *et al.*, 2011; Velarde *et al.*, 2015). Las interacciones planta-patógeno han sido estudiadas en diferentes cultivos y clasificadas en incompatibles y compatibles. En una interacción incompatible la planta es resistente ya que emplea mecanismos de defensa contra el ataque del patógeno y evita el desarrollo del daño (Batista *et al.*, 2011). La generación de señales locales en respuesta a un agresor activa una serie de respuestas defensivas, como la respuesta hipersensible, cambios en la composición y rigidez de la pared celular, síntesis y acumulación de fitoalexinas, expresión de proteínas relacionadas a patogénesis y la generación de señales móviles que regulan la inducción de una resistencia sistémica duradera y de amplio espectro

(Dickinson, 2003). La primera línea de defensa activa es la pared celular que sufre varios cambios estructurales y químicos. Las alteraciones que sufre la pared celular incluye la deposición de calosa, ligninas, compuestos antimicrobianos, entrecruzamiento de proteínas de la pared celular como resultado de la explosión oxidativa (Wang *et al.*, 2005; Develey y Galiana, 2007). La acumulación de materiales adicionales en la pared celular alrededor del área de infección previene la expansión del patógeno y protege a los tejidos de las plantas (Schmelzer, 2002; Van Baarlen *et al.*, 2007). En una interacción compatible, la planta susceptible es infectada por un patógeno adaptado capaz de evadir sus defensas, lo que permite el desarrollo del daño, el cual comúnmente conduce a la muerte. Estudios demuestran que en algunas plantas la reacción de defensa puede ser retrasada o el patógeno puede emplear mecanismos para inhibir la defensa (Desender *et al.*, 2007; Rinaldi *et al.*, 2007). La comprensión de las interacciones planta-patógeno permitirá un mejor manejo de las respuestas de defensa de la planta, las cuales pueden apoyar al desarrollo de nuevas estrategias para el control de enfermedades en plantas (Van Baarlen *et al.*, 2007).

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar estrategias para el estudio de diferentes cepas de *Fusarium oxysporum* aislados de plantas de garbanzo con síntomas de fusariosis en la zona del Bajío, México.

OBJETIVOS PARTICULARES

Caracterizar a las razas patogénicas 1, 2, 3, 4 y 5 de *Foc* mediante marcadores específicos de DNA y secuencias de genes conservados con la finalidad de identificar alguna (s) de ellas en aislados de plantas de garbanzo con fusariosis en la región del Bajío.

Análisis de las secuencias de TEF, ITS y mtSSU para identificar a las especies o complejos a los cuales están asociados los aislamientos de la región de Bajío.

Evaluar el daño que causan representantes del complejo de especies de *Fusarium* aislados de plantas de garbanzo y chile manzano en diferentes cultivos hortícolas para conocer e identificar la respuesta que inducen estos hongos en los cultivos.

Evaluar el daño que causan representantes del complejo de especies de *F. oxysporum* en diferentes cultivares de chile (*Capsicum annuum* y *Capsicum pubescens*) para conocer los posibles mecanismos que confieren la susceptibilidad y tolerancia a estos patógenos.

REFERENCIAS

- Arvayo O., R., M., M. Esqueda., E. Acedo F., A. Sánchez. A. Gutiérrez. 2011. Morphological variability and races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* associated with Chickpea (*Cicer arietinum*) crops. American Journal of Agricultural and Biological Sciences 6: 114-121.
- Baayen R., P., K. O'Donnell., J. M. Bonants P., E. Cigelnik K., L., J. A. Roebroek E., C. Waalwijk. 2000. Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic formae speciales causing wilt and rot disease. Phytopathology 90: 891-900.
- Baayen R., P., K. O'Donnell., J. M. Bonants P., E. Cigelnik, N. M. Kroon L., P., J. A. Roebroek E., C. Waalwijk. 2000. Gene genealogies and AFLP analyses within the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and non-monophyletic formae specialis causing wilt and rot disease. Phytopathology 90: 891-900.
- Baayen R., P., K. O'Donnell., S. Breeuwsma., M. Geiser D., C. Waalwijk. 2001.

- Molecular relationships of fungi within the *Fusarium redolens*-*F. hostae* clade. *Phytopathology* 91: 1037–1044.
- Bao J., R., D. Fravel R., N. O'Neill R., G. Lazarovits., V. Berkum P. 2002. Genetic analysis of pathogenic and non-pathogenic *Fusarium oxysporum* from tomato plant. *Canadian Journal of Botany* 80: 271-279.
- Chandra N., S., G. Wulff E., C. Udayashankar A., P. Nandini B., R. Niranjana S., N. Mortensen C., S. Prakash H. 2011. Prospects of molecular markers in *Fusarium* species diversity. *Applied Microbiology and Biotechnology* 90:1625–1639.
- Desender S., D. Andrivon F., V. 2007. Activation of defence reactions in Solanaceae: where is the specificity? *Cellular Microbiology* 9: 21–30.
- Develey R., M., E. Galiana. 2007. Resistance to pathogens and host developmental stage: a multifaceted relationship within the plant kingdom. *New Phytologist* 175: 405–416.
- Dickinson M. 2003. *Molecular Plant Pathology*. Scientific Publishers London pp 145–95.
- Edel-Hermann V., G. Nadine., M. Arnaud., C. Steinberg. 2015. *Fusarium* diversity in soil using a specific molecular approach and a cultural approach. *Journal of Microbiological Methods* 111: 64–71.
- Geiser D., M., M. Mar. Jiménez G., S. Kang., I. Makalowska., N. Veeraraghavan., W. Todd J., N. Zhang., K. Gretchen A., K. O'Donnell. 2004. FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology* 110: 473–479.
- Haware M., P., L. Nene Y. 1982. Races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. *Plant Disease* 66: 809–810.

- Jiménez G., M., M., J. A. Navas C., R. M. Jiménez D. 2004. The *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*/*Cicer arietinum* pathosystem: a case study of the evolution of plant-pathogenic fungi into races and pathotypes. *International Microbiology* 7: 95–104.
- Lievens B., Rep M., B. Thomma J. 2008. Recent developments in the molecular discrimination of *formae speciales* of *Fusarium oxysporum*. *Pest Management Science* 64: 781–788.
- López L., A., E. Valadez M., L. Zelaya M., N. Marban M., H. V. Silva R. 2008. *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* and *Giberella fujikuroi* species complex causing wilting and yellowing in *Cicer arietinum*. *Journal of Plant Pathology* 90: 84.
- Luna P., A., H. V. Silva R., N. Marbán M., y E. Valadez M. 2004. Variabilidad genética de *Fusarium oxysporum* Schlechtend.:FR. F. sp. *ciceris* (Padwick) Matuo y K. Sato mediante PCR-RAPD'S en el Bajío México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22: 44-51.
- Medina M., C., G. M. Beltrán R., A. López L., L. X. Zelaya M., E. Valadez M. 2014. Characterization and Identification of *Fusarium* Species Complex Affecting Chickpea with Total Protein Profiles, TEF Gen. *Annual Research and Review in Biology* 4: 3513-3523.
- Nitschke E., M. Nihlgard., and M. Varrelmann. 2009. Differentiation of eleven *Fusarium* spp. isolated from sugar beet, using restriction fragment analysis of a polymerase chain reaction–amplified translation elongation factor-1 α gene fragment. *Phytopathology* 99: 921-929.
- O'Donnell K, E. Cigelnik., I. Nirenberg H. 1998b. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex of *Fusarium*.

Mycologia 90: 465-493.

O'Donnell K., C. Kistler H., E. Cigelnik., C. Ploetz R. 1998a. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. Proceedings of the National Academy of Science USA 95: 2044-2049.

O'Donnell K., C. Kistler H., K. Tacke B., H. Casper. 2000. Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. Proceedings of the National Academy of Science USA 97: 7905–7910.

Ortoneda M., J. Guarro., M. P. Madrid., Z. Caracuel, M. I. G. Roncero., E. Mayayo., and A Di Pietro. 2004. Infection and Immunity 72: 1760–1766.

Rinaldi C, A. Kohler., P. Frey., F. Duchaussoy., N. Ningre., A. Couloux., P. Wincker., D. Le Thiec., S. Fluch., F. Martin., S. Duplessis. 2007. Transcript profiling of poplar leaves upon infection with compatible and incompatible strains of the foliar rust *Melampsora larici-populina*. Plant Physiology 144: 347–366.

Roncero M., I., H. Concepción., M. Ruiz R., F. I. García M., M. P. Madrid., Z. C. Fernando C., J. Delgado J., R. Roldán R., A. L. Martínez R., C. Velasco., J. Roa., M. Martín U., A. D. Córdoba, D., P. Fusarium as a model for studying virulence in soilborne plant pathogens. 2003. Physiological and Molecular Plant Pathology 62: 87–98.

Schmelzer E. 2002. Cell polarization, a crucial process in fungal defence. Trends in Plant Science 7:411-415.

- Singh B., P., R. Saikia., M. Yadav., R. Singh., S. Chauhan V., K. Arora D. 2006. Molecular characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* causing wilt of chickpea. African Journal of Biotechnology 5: 497-502.
- Skovgaard K., I. Nirenberg H., K. O'Donnell., S. Rosendahl. 2001. Evolution of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* races inferred from multigene genealogies. Phytopathology 91: 1231–1237.
- Smith S., N. 2007. An overview of ecological and habitat aspects in the genus *Fusarium* with special emphasis on the soil-borne pathogenic forms. Plant Pathology 16:97–120.
- Sosa P., R. 2012. Métodos alternativos de control de rabia en el cultivo de garbanzo. VIII Jornada del cultivo de garbanzo. Fundación Produce Sinaloa, A.C.
- Van Baarlen P., J. Woltering E., M. Staats J. Van K., A. 2007. Histochemical and genetic analysis of host and non-host interactions of *Arabidopsis* with three *Botrytis* species: an important role for cell death control. Molecular Plant Pathology 8: 41-54.
- Velarde F., S., P. F. Ortega M., G. A. Fierros L., I. Padilla V., E. Gutiérrez P., F. G. Rodríguez C., J. A. López V., J. A. Acosta G., J. A. Garzón T. 2015. Identificación molecular y biológica de las razas 0 y 5 de *Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr f. sp. *ciceris* (Padwick) Matuo y K. Sato del garbanzo en el noroeste de México. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 6: 4.
- Wang D., Weaver N., Kesarwani M. 2005. Induction of protein secretory pathway is required for systemic acquired resistance. Science 308: 5724: 1036–1040.
- Watanabe M, T. Yonezawa., K. Lee, S. Kumagai., Y. Sugita K., K. Goto and Y. Hara-Kudo. Watanabe *et al.* 2011. Molecular phylogeny of the higher and lower

taxonomy of the *Fusarium* genus and differences in the evolutionary histories of multiple genes. *BMC Evolutionary Biology* 11: 322

Wongpita A., K. Lomthaisong. 2010. Changes in the 2DE protein profiles of chilli pepper (*Capsicum annuum*) leaves in response to *Fusarium oxysporum* infection. *Science Asia* 36: 259–270.

Zhao B., Y. Jianfang., Z. Shuo., L. Xian., G. Zenggui. 2014. Phylogeny and pathogenicity of *Fusarium* spp. isolated from greenhouse melon soil in Liaoning Province. *Saudi Journal of Biological Sciences* 21: 374-379.

Capítulo I: Revisión de literatura

1.1 *Fusarium oxysporum*

Las especies del género *Fusarium* son conocidos como patógenos de plantas y productores de toxinas asociados a la muerte de animales y humanos (Watanabe, 2011). Representan el grupo más importante de hongos fitopatógenos capaces de dañar a los cultivos durante cualquier etapa de desarrollo (Ma, 2010). Los miembros del complejo de especies de *Fusarium oxysporum* (FOSC) son patógenos del suelo, responsables de la marchitez vascular, daño de la raíz y *damping-off* de un amplio rango de cultivos. Es la especie más comúnmente encontrada y económicamente importante dentro del género *Fusarium* (O'Donnell *et al.*, 2009). Recientes trabajos han propuesto que *F. oxysporum* representa un complejo de varias especies y que una sola de ellas puede causar daño en diferentes cultivos (O'Donnell *et al.*, 2008; O'Donnell *et al.*, 2009). Los miembros de FOSC exhiben una compleja plasticidad genética, debido a que causan algunas de las enfermedades más destructivas en más de 150 especies de plantas de importancia agronómica (Ma *et al.*, 2013).

El daño que causan estos patógenos es un factor ampliamente limitante para la producción de alimentos (Zhao *et al.*, 2014), debido a que pueden infectar a una amplia variedad de hospedantes y causar varios tipos de enfermedades. Después de la germinación y penetración en la raíz, el hongo entra al sistema vascular de la planta y subsecuentemente usa los vasos del xilema como avenidas para colonizar rápidamente al hospedante, desencadenando el marchitamiento masivo, la necrosis y clorosis de las partes aéreas, y causando síntomas de marchitez durante cualquier etapa de desarrollo de las plantas (Roncero *et al.*, 2003; Smit, 2007; Chandra *et al.*, 2011). Por otro lado, son productores

de micotoxinas como: ácido fusarico, licomarasmina, funomisinas y tricotecinas, los cuales ocasionan la muerte y degradación de las células, el cierre parcialmente de los estomas, la degradación de la clorofila y la reducción de la actividad fotosintética (Edel-Hermann, 2015).

1.2 La evolución de *Fusarium oxysporum*

Los hongos, como todos los organismos vivos, tienen la habilidad de adaptarse en respuesta a cambios o nuevos ambientes. Los cambios ambientales ejercen presión de selección en un organismo (McDonald, 1997). La capacidad de las poblaciones de patógenos a adaptarse es determinada, en parte, por su diversidad (McDonald y McDermott, 1993). La evolución en hongos está determinada por cinco fuerzas evolutivas: mutación, selección natural, deriva genética, flujo de genes y sistema de apareamiento (McDonald y Linde, 2002).

1.3 Fusariosis vascular en Garbanzo

F. oxysporum f. sp. *ciceris* (*Foc*) (Padwick) Matuo & K.Sato es el agente causal de una de las enfermedades más destructivas en garbanzo (*Cicer arietinum* L.) limitando su producción a nivel mundial (Jiménez *et al.*, 2004). El daño que ocasiona *Foc* ha sido identificado en todas las áreas donde se cultiva el garbanzo, incluyendo a México, que es el octavo país productor de este cultivo a nivel mundial (FAOSTAT, 2015). *Foc* es el agente causal de la marchitez y amarillamiento en este cultivo, cuyo término genérico es “fusariosis”. Ambos síntomas son consecuencia de infecciones vasculares, acompañado de una coloración castaño oscura del xilema y medula de la raíz, cuello y tallo en las plantas infectadas (Jiménez *et al.*, 2004). Se ha demostrado que el micelio y conidios

colonizan los vasos del xilema, en el que se mueven y multiplican, ocasionando el bloqueo completo del transporte de agua y nutrientes (Nimbalkar *et al.*, 2006). Cuando se produce marchitez, la planta sufre rápida flacidez y clorosis color verde mate en las hojas con ausencia de amarillamiento; la clorosis se extiende poco después al resto de la planta, y la flacidez es seguida por la desecación de hojas y tallos, los folíolos permanecen adheridos al raquis y posteriormente muere 20 días después de la infección. El amarillamiento induce clorosis foliar progresiva y vascular, amarillez y necrosis de folíolos que progresan de forma acrópeta en la planta dando lugar a la defoliación y muerte 40 días después de la inoculación (Jiménez *et al.*, 2004). Los cultivares resistentes son una de las pocas alternativas de manejo, pero su desarrollo no ha sido ampliamente empleado debido características agronómicas no deseables, como por ejemplo, el bajo rendimiento, la calidad del grano y porte de la planta (Jiménez *et al.*, 2004). Estos dos patotipos (tipos de daño), son causados por ocho razas patogénicas (0, 1A, 1B/C, 2, 3, 4, 5 y 6) basados en la reacción de un set de cultivares diferenciales en garbanzo. Las razas 0 y 1B/C inducen síntomas de amarillamiento, mientras que el resto, causan marchitez (Haware y Nene, 1982). Las razas 2, 3 y 4 fueron reportadas solo en la India, las razas 0, 1B/C, 5 y 6 han sido encontradas en la región del Mediterráneo, Estados Unidos y México (Arvayo *et al.*, 2011 y Velarde *et al.*, 2015). La raza 1A ha sido reportada en la India, California (EU) y en la región del Mediterráneo (Haware y Nene, 1982; Jiménez *et al.*, 2004).

1.4 Análisis de secuencias de DNA

El estudio de *Fusarium* ha sido difícil, debido a que cepas con morfología similar muestran diferencias considerables a nivel de DNA, lo cual ha limitado establecer un sistema taxonómico adecuado (Chandra *et al.*, 2011, Geiser *et al.*, 2004). Recientemente,

se han realizado análisis filogenéticos para examinar la taxonomía de especies de *Fusarium* y se ha propuesto un nuevo sistema basado en el concepto de especie filogenética (organismos con características diagnósticas diferentes a las de otros grupos similares y que además exhiben un patrón de ancestro y descendencia) (Watanabe, 2011). O'Donnell *et al.* (1998a, 1998b) estudiaron múltiples genes o porciones de ellos con los que estimaron la relación genética de diferentes especies de *Fusarium*, demostrando que *Fusarium* representa complejos de especies que comprenden una colección de varios linajes clonales.

En la actualidad, las técnicas más informativas empleadas para el diagnóstico de hongos es la secuenciación de DNA (Baayen *et al.*, 2001). El gen TEF (Factor 1- α de extensión y traducción) se ha convertido en el marcador de elección, como una herramienta de identificación de locus único en *Fusarium*; además, este marcador ha demostrado ser altamente informativo para relacionar desde el punto de vista genético aquellos hongos que comparten similitudes y por sí solo puede ser suficiente para resolver relaciones filogenéticas; además, se ha utilizado entre los organismos de una misma especie o de un mismo género para conocer el parentesco entre ellos (Geiser *et al.*, 2004). El gen TEF fue identificado como una región para estudios filogenéticos y taxonómicos en *Fusarium* spp., permitiendo diferenciar especies (O'Donnell *et al.*, 2000b; Baayen *et al.*, 2001; Skovgaard *et al.*, 2001).

La región ITS (sus siglas en ingles; espacio transcrito interno) también ha sido considerada como un marcador para la identificación de especies en diferentes organismos, entre ellos los hongos, debido a que es una región altamente conservada (O'Donnell, 1992). El gen mtSSU (sus siglas en ingles; subunidad pequeña del ribosoma de la mitocondria) ha sido empleado para evaluar distintas especies (Baayen *et al.*, 2000, 2001; O'Donnell *et al.*,

2000) ayudando a elucidar la relación evolutiva con varias formas especiales de *F. oxysporum* (O'Donnell *et al.*, 1998). Otra zona relacionada con los genes ribosomales es la variación en el espacio intergénico o IGS (sus siglas en inglés) que se ha utilizado para resolver relaciones intraespecíficas en este mismo género de patógenos; así como el gen de nitrato reductasa (Skovgaard *et al.*, 2001).

1.5 Interacción planta-patógeno

El éxito o fracaso del establecimiento del daño por hongos en plantas depende del mutuo reconocimiento entre el hongo y la planta. Los mecanismos de reconocimiento involucran la expresión de factores de virulencia y patogenicidad en el hongo, mientras que en la planta éstos se basan en la existencia de pasivos, preformados y/o compuestos inducibles de defensa. Varias proteínas de hongos han sido asociados con patogenicidad o virulencia, así como enzimas de degradación de la pared celular, inhibidores de proteínas y enzimas involucradas en la síntesis de toxinas (Walter *et al.*, 2010). El reconocimiento y eventos de señalización que ocurren en las células de plantas en respuesta a cambios por microorganismos debe ser extremadamente rápido, fiable y específico, y forman parte de la estrategia de evolución de las plantas para sobrevivir al ataque por patógenos (Metha *et al.*, 2008). La percepción sensible e intracelular de los patógenos y el reconocimiento de patrones asociados a patógenos conduce a la activación de una respuesta de defensa basal de la planta, que incluye mecanismos genéricos no específicos, deposición de papila, acidificación apoplastica, transducción de señales y transcripción de genes de defensa (Alfano and Collmer, 2004).

El resultado más comúnmente observado entre las interacciones planta-hongo es la ausencia del daño debido a las interacciones incompatibles asociadas a mecanismos de

defensa. De modo que el éxito del patógeno para colonizar el tejido vegetal y para establecer la enfermedad dependerá de la capacidad de interferir o suprimir la defensa basal (Mehta *et al.*, 2008).

Además de las proteínas relacionadas con las respuestas de defensa basales, ciertos genotipos de plantas expresan un tipo diferente de proteínas llamados R o proteínas de resistencia que provocan una específica y definida respuesta genética definida como respuesta hipersensible y posterior muerte celular programada. El papel de la respuesta hipersensible es restringir al patógeno, lo que implica varias perturbaciones bioquímicas, conocido como respuestas genéricas de las plantas, incluyendo cambios en flujos de iones, hiperperoxidación lipídica, fosforilación, generación de óxido nítrico y una explosión de especies reactivas de oxígeno y compuestos antimicrobianos (Mohammadi y Kazemi, 2002). Esta rápida respuesta incompatible efectivamente pone fin a la invasión de patógenos y evita el desarrollo del daño (Alfano y Collmer, 2004).

La capacidad de los patógenos para superar la defensa de las plantas mediante la protección de sí mismos del estrés oxidativo activado por la planta en respuesta a la percepción de patógenos, es crítico en el resultado del daño. La actividad de proteínas fúngicas, tales como la catalasa y la superóxido dismutasa, son responsables de la inactivación de H_2O_2 y O_2^- . Los patógenos también producen proteínas efectoras que ayudan en la supresión de la resistencia basal a través de la modificación de proteínas específicas de hospedantes. Durante la infección, las enzimas extracelulares producidas por los patógenos son factores críticos adicionales en el establecimiento de la enfermedad (Van Sluys *et al.*, 2002).

1.6 Referencias

- Alfano J., R., A. Collmer. 2004. Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defence. *Annual Review of Phytopathology* 42: 385–414.
- Arvayo O., R., M., M. Esqueda., E. Acedo F., A. Sánchez., A. Gutiérrez. 2011. Morphological variability and races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* associated with Chickpea (*Cicer arietinum*) crops. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* 6: 114-121.
- Baayen R., P., K. O'Donnell, J. M. Bonants P., Cigelnik E., N. M. Kroon L., P., J. A. Roebroek E., Waalwijk C. 2000. Gene genealogies and AFLP analyses within the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and non-monophyletic *Formae specialis* causing wilt and rot disease. *Phytopathology* 90: 891–900.
- Baayen R., P., K. O'Donnell, Breeuwsma S., M. Geiser D., Waalwijk C. 2001. Molecular relationships of fungi within the *Fusarium redolens-F hostae* clade. *Phytopathology* 91: 1037–1044.
- Chandra N., S., G. Wulff E., C. Udayashankar A., P. Nandini B., R. Niranjana S, N. Mortensen C., S. Prakash H. 2011. Prospects of molecular markers in *Fusarium* species diversity. *Applied Microbiology and Biotechnology* 90: 1625–1639.
- Edel-Hermann V., Gautheron N., Mounier A., Steinberg C. 2015. *Fusarium* diversity in soil using a specific molecular approach and a cultural approach. *Journal of Microbiological Methods* 111: 64–71.
- FAOSTAT. 2015. Agricultural production. <http://www.faostat.fao.org/>

- Geiser D., M., M. Jiménez G., Kang S., Makalowska I., Veeraraghavan N., Ward T., Zhang N., O'Donnell K. 2004. FUSARIUM-ID v.1.0: a DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology* 110: 473–479.
- Haware M., P., L. Nene Y. 1982. Races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. *Plant Disease* 66: 809–810.
- Jiménez G., M., M., J. A. Navas C., R. M. Jiménez D. 2004. The *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*/*Cicer arietinum* pathosystem: a case study of the evolution of plant-pathogenic fungi into races and pathotypes. *International Microbiology* 7: 95–104.
- Jiménez D., R., M. Castillo P., M. M. Jiménez G., Landa B. B., N. Cortés J. A. 2015. *Fusarium* wilt of chickpeas: Biology, ecology and management. *Crop Protection* 73:16-27.
- Ma D., LJ., H. Charlotte V., A. Borkovich K., J. Coleman J., J. Daboussi M., DPietro A., Dufresne M., Freitag M., Grabherr M., Henrissat B., M. Houterman P., Kang S., B. Shim W., Woloshuk C., Xie X., R. Xu J., Antoniw J., E. Baker S. et al. 2010. Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature*, 464: 367-373.
- Ma D., LJ., M. Geiser., H. Robert P., A. Rooney., K. O'Donnell, F. Trail., D. Gardiner., J. M. Manners., K. Kazan. 2013. *Fusarium* Pathogenomics. *Annual Review of Microbiology* 67: 399–416.
- McDonald B., A., M. McDermott J. 1993. Population genetics of plant pathogenic fungi. *BioScience* 43: 311–319.
- McDonald B., A. 1997. The population genetics of fungi: tools and techniques. *Phytopathology* 87: 448–453.

- McDonald B., A., C. Linde. 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* 40: 349–379.
- Mehta A., C. M. Brasileiro A., S. L. Souza D., E. Romano., A. Campos M., F. Grossi-de-Sa M., S. Silva M., L. Franco O., R. Fragosso R., R. Bevitori., L. Rocha T. 2008. Plant-pathogen interactions: what is proteomics telling us? *The FEBS Journal* 275: 3731–3746.
- Mohammadi M., Kazemi H. 2002. Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. *Plant Science* 162: 491–498.
- Nimbalkara S., B., M. Harsulkara A., A. Giria P., M. Sainania N., V. Franceschib, V. Gupta S. 2006. Differentially expressed gene transcripts in roots of resistant and susceptible chickpea plant (*Cicer arietinum* L.) upon *Fusarium oxysporum* infection. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 68: 176–188.
- O'Donnell K. 1992. Ribosomal DNA internal transcribed spacer are highly divergent in the phytopathogenic asco-mycete *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicaries*). *Current Genetics* 22: 213–220.
- O'Donnell K., O., C. Kistler H., E. Cigelnik. 1998a. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95: 2044-2049.
- O'Donnell K., Cigelnik E., I. Nirenberg H. 1998b. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex of *Fusarium*. *Mycologia* 90: 465-493.

- O'Donnell K., Nirenberg H., I. Aoki T., Cigelnik E. 2000b. A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: detection of additional phylogenetically distinct species. *Mycoscience* 41: 61–78.
- O'Donnell K., C. Gueidan., S. Sink., P. R. Johnston., P. W. Crous., A. Glenn., R. Riley., N. C. Zitomer., P. Colyer., C. Waalwijk., T. Van der Lee., A. Moretti., S. Kang., H. Kim., D. M. Geiser., J. H. Juba., R. P. Baayen., M. G. Cromeý., S. Bithell., D.A. Sutton., K. Skovgaard. 2009. A two-locus DNA sequence database for typing plant and human pathogens within the *Fusarium oxysporum* species complex. *Fungal Genetics and Biology* 46: 936–948.
- Roncero M., I., G., C. Hera., M. Ruiz R., F. I. García M., M. P. Madrid., Z. Caracuel., F. Calero., J. Delgado J., R. Roldan R., A. L. Martínez R., C. Velasco., J. Roa., M. Martín U., D. Córdoba, A. Di Pietro. *Fusarium* as a model for studying virulence in soilborne plant pathogens. 2003. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 62: 7–98.
- Skovgaard K., I. Nirenberg H., K. O'Donnell. 2001. Evolution of *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* races inferred from multigene genealogies. *Phytopathology* 91: 1231–1237.
- Smith S., N. 2007. An overview of ecological and habitat aspects in the genus *Fusarium* with special emphasis on the soil-borne pathogenic forms. *Plant Pathology Bull* 16: 97–120.
- Sosa P., R., 2012. Métodos alternativos de control de rabia en el cultivo de garbanzo. VIII Jornada del cultivo de garbanzo. Fundación Produce Sinaloa, A.C. Pp. 25-34
- Van S., M., A., C. B. Monteiro V., E. A. Camargo L., F. M. Menck C., C. R. Da Silva A., A. Ferro J., C. Oliveira M., C. Setubal J., P. Kitajima J., J Simpson A. 2002.

- Comparative genomic analysis of plant-associated bacteria. Annual Review
Phytopathology 40: 169–189.
- Velarde F., S., P. F. Ortega M., G. A. Fierros L., I. Padilla V., E. Gutiérrez P., F. G.
Rodríguez C., J. A. López V., J. A. Acosta G., J. A. Garzón T. 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.
Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 6: 4.
- Walter S., Nicholson P., M. Doohan F. 2010. Action and reaction of host and pathogen
during *Fusarium* head blight disease. New Phytologist 185: 54–66.
- Watanabe M., Takahiro Y., Ken-ichi L., Susumu K., Yoshiko S., K., Keiichi G., and
Yukiko H., K. Watanabe et al. 2011. Molecular phylogeny of the higher and lower
taxonomy of the *Fusarium* genus and differences in the evolutionary histories of
multiple genes. BMC Evolutionary Biology 11: 322.
- Zhao B., Y. Jianfang., Z. Shuo., L. Xian, G. Zenggui. 2014. Phylogeny and pathogenicity
of *Fusarium* spp. isolated from greenhouse melon soil in Liaoning Province. Saudi
Journal of Biological Sciences 21: 374-379.

Capítulo II. Comparación genética de razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* con aislamientos de plantas de garbanzo en el Bajío, México

Resumen

Fusarium oxysporum f. sp. *ciceris* (*Foc*) es un hongo fitopatógeno causante de la enfermedad conocida como fusariosis vascular en garbanzo (*Cicer arietinum* L.). El daño que ocasiona este patógeno es uno de los factores más importantes que limita la producción en este cultivo a nivel mundial. Los cultivares resistentes son una de las pocas alternativas de manejo, pero su desarrollo no ha sido ampliamente empleado debido a que sus características agronómicas no son las más adecuadas. En México la información referente a la identificación de razas fisiológicas es escasa, es por ello que el objetivo fue caracterizar a las razas 1, 2, 3, 4 y 5 de *Foc* mediante marcadores específicos de DNA y secuencias de genes conservados con la finalidad de identificar alguna (s) de ellas en cuatro aislados identificados como *Foc* de plantas de garbanzo con fusariosis en la región del Bajío (Guanajuato y Michoacán), México. Se emplearon primers específicos para la identificación de las razas 0, 1B/C, 5 y 6 y se secuenciaron los genes TEF, mtSSU, ITS, IGS rDNA y NIR para los aislamientos del Bajío y las razas 1, 2, 3, 4 y 5. Los resultados obtenidos indican que los aislamientos del Bajío no pertenecen a las razas descritas para *Foc* pero presentan patotipos similares a los causados por éstas. Los análisis filogenéticos mostraron resultados variables al compararlos con las cinco razas de *Foc* y accesiones de referencia para esta misma especie.

Palabras clave: Fusariosis, razas patogénicas, filogenia, TEF, mtSSU, ITS.

2.1 Introducción

Fusarium oxysporum f. sp. *ciceris* (*Foc*) (Padwick) Matuo & K.Sato es el agente causal de una de las enfermedades más destructivas en garbanzo (*Cicer arietinum* L.) limitando su producción a nivel mundial (Jiménez *et al.*, 2004). El daño que ocasiona *Foc* ha sido identificado en todas las áreas donde se cultiva garbanzo, incluyendo a México, que es el octavo país productor de este cultivo a nivel mundial (FAOSTAT, 2015). *Foc* es el agente causal de la marchitez y amarillamiento en este cultivo, cuyo término genérico es “fusariosis”, ambos síntomas son consecuencia de infecciones vasculares, acompañado de una coloración castaño oscura del xilema y medula de la raíz, cuello y tallo en las plantas infectadas (Jiménez *et al.*, 2004). Se ha demostrado que el micelio y conidios colonizan los vasos del xilema, en el que se mueven y multiplican, ocasionando el bloqueo completo del transporte de agua y nutrientes (Nimbalkar *et al.*, 2006). Cuando se produce marchitez, la planta sufre rápida flacidez y clorosis color verde mate en las hojas con ausencia de amarillamiento; la clorosis se extiende poco después al resto de la planta, y la flacidez es seguida por la desecación de hojas y tallos, los folíolos permanecen adheridos al raquis y posteriormente muere 20 días después de la infección. El amarillamiento induce clorosis foliar progresiva y vascular, amarillez y necrosis de folíolos que progresan de forma acrópeta en la planta dando lugar a la defoliación y muere 40 días después de la inoculación (Jiménez *et al.*, 2004). Algunas micotoxinas producidas por *Fusarium oxysporum* son: ácido fusarico, licomarasmina, funomisinas y tricotecinas, los cuales ocasionan la muerte y degradación de las células, el cierre parcial de los estomas, la reducción de la clorofila y la detención de la fotosíntesis, antes de la marchitez eventual (Harris *et al.*, 1999; Langevin *et al.*, 2004). Los cultivares resistentes son una de las pocas alternativas de manejo, pero su desarrollo no ha sido ampliamente empleado debido a que

sus características agronómicas no son las adecuadas, como por ejemplo, el bajo rendimiento y calidad del grano y porte de la planta (Jiménez *et al.*, 2004). Estos dos patotipos (tipos de daño), son causados por ocho razas patogénicas (0, 1A, 1B/C, 2, 3, 4, 5 y 6) basados en la reacción de un grupo de cultivares diferenciales en garbanzo. Las razas 0 y 1B/C inducen síntomas de amarillamiento, mientras que el resto, causan marchitez (Haware y Nene, 1982). Las razas 2, 3 y 4 fueron reportadas solo en la India, las razas 0, 1B/ C, 5 y 6 han sido encontradas en la región del Mediterráneo, Estados Unidos (California) (Haware y Nene, 1982; Jiménez *et al.*, 2004) y Noroeste de México (Sonora, Sinaloa, Baja California S.) (Arvayo *et al.*, 2011; Velarde *et al.*, 2015), mientras que la raza 1A ha sido reportada en la India, California y región del Mediterráneo (Haware y Nene, 1982; Jiménez *et al.*, 2004).

La identificación de *Fusarium* spp. se ha basado en características morfológicas, lo cual ha presentado un enorme desafío, debido al uso de diferentes sistemas taxonómicos, insuficiente número de micólogos con experiencia para la identificación y el limitado número de caracteres morfológicos; por lo que el desarrollo y uso de nuevas herramientas en la última década han apoyado a la taxonomía de este género (Jiménez *et al.*, 2011). Las metodologías basadas en el análisis de DNA han hecho posible diferenciar entre especies del género *Fusarium* (Nitschke *et al.*, 2009), para lo cual se han diseñado primers específicos para identificar formas especiales y razas de *Fusarium oxysporum*; pero además se han estudiado genes o regiones del genoma para su estudio filogenético (Lievens *et al.*, 2008). Los análisis del gen TEF (factor 1- α de traducción y extensión) y de la subunidad pequeña del ribosoma mitocondrial (mtSSU) han sido evaluadas en distintas especies ayudando a elucidar la relación evolutiva con varias formas especiales de *F. oxysporum* (O'Donnell *et al.*, 1998; Baayen *et al.*, 2000; O'Donnell *et al.*, 2000;

Baayen *et al.*, 2001). En este sentido se han generado controversias respecto a la identidad de razas; particularmente, Gurjar *et al.* (2009) identificaron con el gen TEF que la raza 3 de *Foc* (causante de marchitez) referida por Jiménez *et al.* (2001) era *F. proliferatum*, lo que demuestra que otras especies de *Fusarium* producen patotipos similares asociados a las razas descritas. Las regiones del espacio transcrito interno (o ITS, sus siglas en inglés) del RNA ribosomal también poseen zonas altamente conservadas, que permiten identificar molecularmente a las especies de patógenos con base en las variaciones nucleotídicas (Bao *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2006). Otra zona relacionada con los genes ribosomales es la variación en el espacio intergénico (o IGS, sus siglas en inglés) que se ha utilizado para resolver relaciones intraespecíficas en *Fusarium*; así como el gen de nitrato reductasa (Skovgaard *et al.*, 2001).

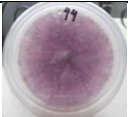
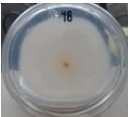
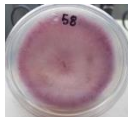
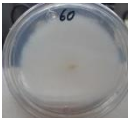
Considerando que *Foc* es un patógeno cosmopolita que ocasiona severos daños a los cultivos, particularmente en México existe escasa información referente a la presencia de las razas fisiológicas reconocidas de este hongo (Arvayo *et al.*, 2011; Velarde *et al.*, 2015). El trabajo realizado por Luna *et al.* (2004) permitió conocer que los aislamientos con patotipos de marchitez y amarillamiento de la región del Bajío, presentaban una amplia variabilidad genética sin identificar en ese momento a las razas de *Foc*. En trabajos posteriores con perfiles proteicos (Medina *et al.*, 2014) y amplificación del gen TEF fue posible identificar las especies (datos no publicados) y complejos de especies (López *et al.*, 2008) de *Fusarium* a los cuales pertenecían dichos aislamientos. Por lo anteriormente expuesto, en el presente estudio se caracterizaron las razas 1, 2, 3, 4 y 5 de *Foc* mediante marcadores específicos de DNA y secuencias de genes conservados con la finalidad de identificar alguna (s) de ellas en aislados de plantas de garbanzo con fusariosis de la región

de Guanajuato, México, que habían sido previamente identificadas como *Foc* de acuerdo al gen TEF, pero que mostraron perfiles de DNA muy variados.

2.2 Materiales y métodos

Origen de las cepas. Se utilizaron 4 aislamientos monospóricos identificados molecularmente como *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (López, 2007) (Cuadro 1). Éstos se aislaron de raíces necrosadas de plantas de garbanzo causantes de síntomas de amarillamiento y marchitez procedentes de los Estados de Guanajuato y Michoacán, aislados y caracterizados por Luna *et al.* (2004).

Cuadro 1. Aislamientos identificados como *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*

Clave	Estado	Lugar de origen	Patotipo en garbanzo	Desarrollo del micelio
GVS44	Guanajuato	Valle de Santiago	Amarillamiento	
GVS48	Guanajuato	Valle de Santiago	Marchitez	
GSa58	Guanajuato	Salvatierra	Marchitez	
GSa60	Guanajuato	Salvatierra	Marchitez	

Extracción de DNA. Los aislamientos fueron incrementados en medio de cultivo PDA (papa-dextrosa-agar) y la extracción de DNA se realizó mediante el método CTAB (Murray y Thompson, 1980).

Como aislados comparativos, se utilizó DNA de las razas 1, 2, 3, 4 y 5 proporcionados por el Dr. Fred J. Muehlbauer de Washington State University, Research, Education, and Economics Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture (USDA-ARS). Éstos se usaron para comparar los pesos moleculares de los fragmentos de DNA referidos por Jiménez y Jiménez (2002) para las razas descritas y definir la ubicación respectiva a las que pudieran pertenecer los cuatro aislamientos en estudio (Cuadro 1) identificados como *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*.

2.2.1 Análisis genético de las razas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* y aislamientos de plantas de garbanzo con fusariosis

Se utilizó el DNA de las cuatro cepas de *Fusarium* y de las cinco razas de *Foc*. Se usaron los primers y las condiciones de PCR descritas en el Cuadro 2 solamente para la identificación de las razas 0, 1B/ C, 5 y 6 de *Foc*, debido a que son las que se han reportado para México.

Cuadro 2. Primers utilizados para la identificación de razas y amplificación de genes de *Fusarium*.

Primer	Secuencia nucleótidos (5' → 3')	Región a identificar	Producto esperado	Condiciones°
Foc R0-M15f	GGAGAGCAGGACAGCAAAGACTA	Raza 0*	≈ 900 pb	61 °C, 28 ciclos
Foc R0-M15r	GGAGAGCAGCTACCCTAGATACACC			
FocR1 B/C-N5f	GAGAGCAGGGTCAGCGTAGATAG	Raza 1 B/ C*	553 pb	61 °C, 28 ciclos
FocR1 B/C-N5r	GCAGCAGAAGAGGAAGAAAATGTA			
FocR5-L10f	GGAAGCTTGGCATGACATAC	Raza 5*	938 pb	61 °C, 30 ciclos
FocR5-L10r	AAGCTTGGGCACCCTCTT			
Foc R6-02f	GAGCAGTCAATGGCAATGG	Raza 6*	1,000 pb	61 °C, 28 ciclos
Foc R6-02r	AGAGCAGGGTCAGCGTAGATA			
Foc R6-P18f	GGAGAGCAGTAGAGTTACAGCAGTATT	Raza 1A, 6*	1,400 pb	61 °C, 25 ciclos
Foc R0-PM15r	GGAGAGCAGCTACCCTAGATACACC			
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGC	ITS•	≈ 800 pb	62 °C, 35 ciclos
NL4	GGTCCGTGTTTCAAGACGG			
EF-1f	ATGGGTAAGGARGACAAGAC	TEF•	≈ 1,000 pb	58 °C, 35 ciclos
EF-1r	GGARGTACCAGRSATCTCATG			
MS1f	CAGCAGTCAAGAATATTAGTC	mtSSU•	≈ 700 pb	52 °C, 40 ciclos
MS2r	GCGGATTATCGAATTAAATAAC			
NIR1f	CCGCGGGATCAGACCAGAGCCC	Nitrato reductasa•	≈ 500 pb	60 °C, 35 ciclos
NIR2r	TTTGGAGGTAGAGGATAAGGC			
NL11	CTGAACGCCTCTAAGTCAG	IGS•	≈ 2,500 pb	54 °C, 40 ciclos
CNS1	GAGACAAGCATATGACTAC			

*De acuerdo Jiménez y Jiménez, 2003.

•White *et al.* (1990); O'Donnell, (1993); O'Donnell *et al.* (1998a).

°Condiciones de amplificación: temperatura de alineamiento y número de ciclos de PCR: 2 min a 94°C; 25 o 28 ciclos de 30 s a 94°C, 1 min de temperatura de alineamiento y 30 s a 72°C y una etapa final de 4 min a 72°C.

Amplificación y secuenciación de genes útiles para taxonomía. Para la amplificación de genes y regiones de DNA específicos para *Fusarium*, los primers utilizados y las condiciones de termociclaje se indican en el Cuadro 2. La mezcla de reacción fue preparada en un volumen de 25 µL conteniendo 200 µM de cada dNTP, 1.5 U de *Taq* DNA polimerasa, 1X de amortiguador *Taq*, 1.5 mM de MgCl₂, 20 pmoles de cada primer y 100 ng de DNA. Los productos de PCR fueron verificados en gel de agarosa a 1.2%. Una vez obtenidos los amplicones fueron purificados con la enzima ExoSAP de acuerdo a las condiciones del fabricante (Applied Biosystems BigDye Terminator v3.1 sequencing Kit). Los fragmentos fueron secuenciados con el equipo Applied Biosystems 3130/ Genetic Analyzers.

Análisis de datos. La búsqueda de similitud de nuestras secuencias de DNA obtenidas se realizó por medio del programa BLAST, 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. El análisis filogenético se realizó utilizando el método de *Maximum Likelihood* basado en el modelo de Tamura-Nei, utilizando el programa MEGA6 (Tamura y Nei, 1993; Tamura *et al.*, 2013).

2.3 Resultados y discusión

La rápida y adecuada identificación de razas de *Foc* es importante para el desarrollo eficiente de cultivares resistentes de garbanzo, así como para la correcta actividad de los pesticidas (Rojas y Rondón, 1995). Es por ello que en este trabajo se identificó a nivel de raza a los aislados de *Foc* provenientes de plantas de garbanzo con síntomas de fusariosis, apoyados con el DNA de referencia de las razas 1, 2, 3, 4, y 5 de *Foc* proporcionadas por

la USDA-ARS. Además, el estudio se fortaleció a través de un análisis filogenético utilizando cinco genes conservados.

2.3.1 Identificación de razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* en aislamientos de garbanzo

Los amplicones específicos para la identificación de las razas 0 (900 pb), 1B/ C (553 pb), 5 (938 pb) y 6 (1000 pb) de *Foc* reportados por Jiménez y Jiménez (2003) permitieron observar los siguientes resultados: para la raza 0, el producto amplificado fue de aproximadamente 1500 pb respecto al esperado de 900 pb (Figura 1, gel 1) y se presentó solamente en los aislados R1, R4, R5, GSV44, GSV48 y GSa58. En el gel 2 de la Figura 1 se aprecian productos amplificados pero inespecíficos para la raza 1B/ C (el valor esperado era de 553 pb), por lo que no fue posible tampoco la identificación de esta raza en las cepas consideradas. En el gel 3 de la misma figura, fue posible observar el fragmento específico para la raza 5 de aproximadamente 938 pb. Sin embargo esto se presentó en todas las muestras consideradas (los cuatro aislamientos y en las 5 razas), por lo que el fragmento esperado no resultó exclusivo de dicha raza. En el gel 4 no fue posible observar el fragmento de aproximadamente 1000 pb que define la raza 6. Por el contrario, se observaron fragmentos de diferentes pesos moleculares y menores de 1 kb. De acuerdo a los resultados obtenidos, no fue posible amplificar los fragmentos específicos que definen e identifican a las razas descritas por Jiménez y Jiménez (2003) no fue posible amplificarlos ni en los DNAs comparadores ni en los cuatro aislamientos de *Foc*. Estos resultados contradictorios, se pueden deber, en primer lugar al origen de los aislamientos y a su posible variación genética; ya que para el diseño de los primers, Jiménez y Jiménez (2003) utilizaron aislamientos principalmente originarios de España. En segundo lugar,

nuestros resultados sugieren que los patotipos de marillamiento y marchitez pueden ser producidos por otras especies de *Fusarium* y no necesariamente por razas de *Foc*, lo que causa confusión para la identificación específica de este hongo fitopatógeno cosmopolita.

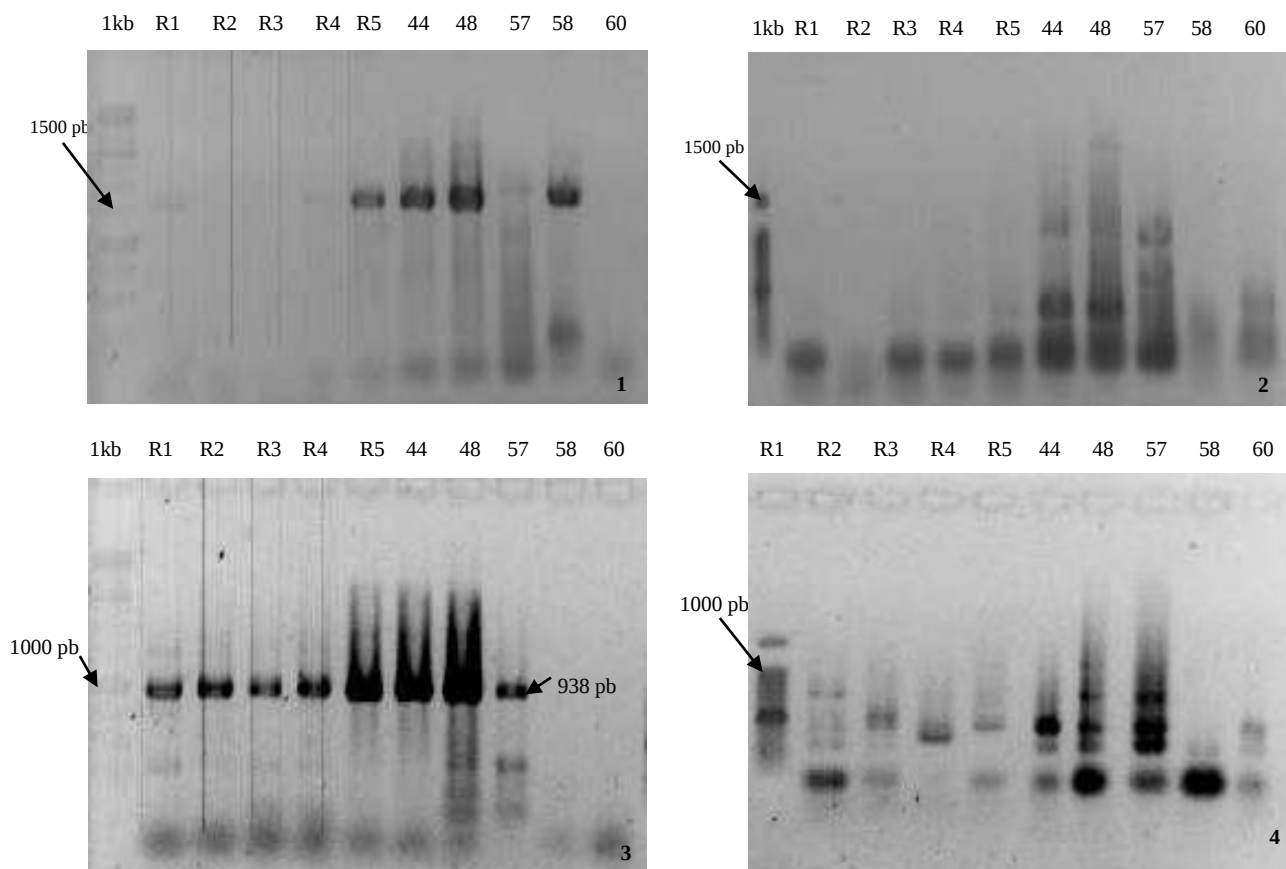


Figura 1. Análisis electroforético en agarosa 1.2 % de los productos de amplificación por PCR de los fragmentos distintivos para las razas 0 (900 pb), 1B/ C (553 pb), 5 (938 pb) y 6 (1000 pb) de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, los cuales se muestran en los geles 1, 2, 3 y 4 respectivamente. De todos éstos, sólo fue posible identificar a la raza 5 (938 pb), en el gel 3. Raza 1 (R1), raza 2 (R2), raza 3 (R3), raza 4 (R4) y Raza 5 (R5), GSV44 (44), GSV48 (48), GSa58 (58) y GSa60 (60).

En estudios previos (Luna *et al.*, 2004; López *et al.*, 2008; Medina *et al.*, 2014), los cuatro aislamientos utilizados fueron inoculados en plantas diferenciales de garbanzo bajo condiciones de invernadero para realizar las pruebas de patogenicidad respectivas. La sintomatología mostrada en las plantas diferenciales con los aislamientos GVS48 y GSa58 fue marchitez, tal como se describió anteriormente (Haware y Nene, 1982) y las plantas

afectadas murieron después de 20 días. Por ello, se esperaba identificar a cualquiera de las razas causales de este patotipo (1, 1A, 2, 3, 4, 5 ó 6). Esto efectivamente, se logró, al asociar todos los aislamientos en estudio con la raza 5, de acuerdo al peso molecular de los amplicones. Sin embargo, el aislamiento GVS44, que produjo amarillamiento, se esperaba que perteneciera a las razas 0 ó 1B/ C de acuerdo a Haware y Nene (1982). Sin embargo, tampoco se lograron amplificar los fragmentos esperados de ninguna de las razas 0 ó 1B/ C. Cabe mencionar que este aislamiento ocasionó muerte de las plantas diferenciales a los 8 días después de la inoculación, lo que lo resalta como el más agresivo de los cuatro utilizados. Asimismo, este comportamiento no concuerda con lo reportado para la raza 0, cuyo patotipo no logra destruir a la planta. Por lo tanto podemos decir que de acuerdo a las inoculaciones realizadas por López (2007), los patotipos de marchitez o amarillamiento no está asociado a las razas descritas de *Foc*. Esta fue la principal razón por la que se procedió a secuenciar genes útiles para filogenia.

2.3.2 Análisis filogenético de aislamientos del Bajío y razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*

Los amplicones correspondientes a los genes TEF, mtSSU, ITS, IGS rDNA y NIR obtenidos para los aislamientos GVS44, GVS48, GSa58 y GSa60; así como para las razas 1, 2, 3, 4 y 5 se muestran en la Figura 2. En los diferentes geles de esta Figura se visualiza el peso molecular aproximado de acuerdo a White *et al.* (1990), O'Donnell *et al.* (1998a), y O'Donnell (1993). En algunos casos el peso molecular de los fragmentos fue diferente; por ejemplo, el gen *mtSSU* de la raza 1 (Gel 2) mostró menor peso molecular (600 pb) respecto al resto de los aislamientos (700 pb). Lo mismo se observó para la región IGS rDNA del aislamiento GVS48 (Gel 4) en donde el fragmento amplificado fue de

aproximadamente 3000 pb, diferente al resto de los aislamientos los cuales amplificaron de 2500 pb.

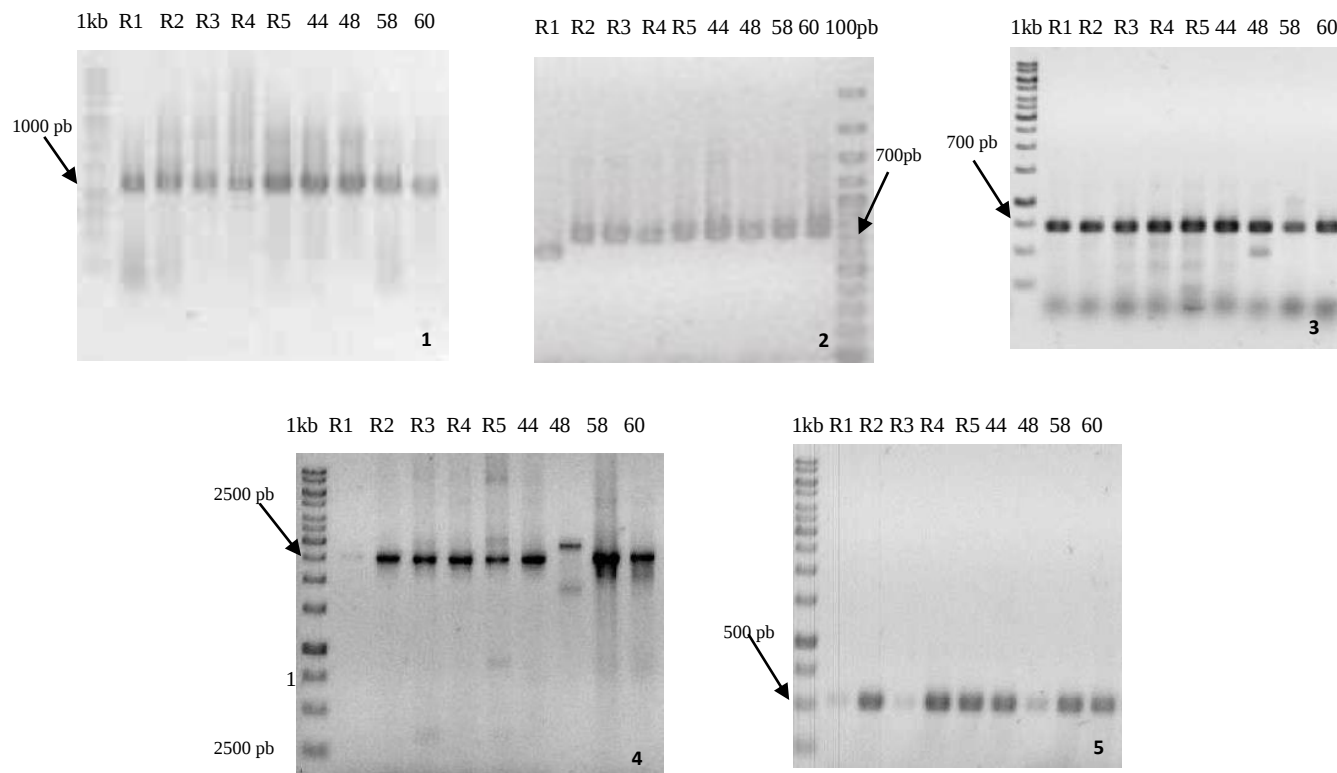


Figura 2. Amplificación de fragmentos de los siguientes genes marcadores; 1: *TEF* (1000 pb), 2: *mtSSU* (700 pb), 3: *ITS* (800 pb), 4: *IGS* (2500 pb) y 5: *NIR* (500 pb) de las cinco razas de *Foc* y cuatro aislamientos de garbanzo de la región del Bajío. Raza 1 (R1), raza 2 (R2), raza 3 (R3), raza 4 (R4) y Raza 5 (R5), GSV44 (44), GSV48 (48), GSV58 (58) y GSV60 (60).

Una vez amplificados los fragmentos de los genes referidos, se obtuvieron las secuencias respectivas y se realizaron los alineamientos múltiples con accesiones registradas en el GenBank, todas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*. Para comparar la región ITS se utilizaron las accesiones: AF491870, KJ000583, AF491869 y KJ000584 que corresponden a las razas 0 y 5 (Jiménez y Jiménez, 2003; Valverde *et al.*, 2015); las secuencias del gen *TEF* se compararon con las accesiones: FJ538240, FJ538241 y FJ538243 (Gurjar *et al.*, 2009), AF346503 (Jiménez *et al.*, 2002) y FJ538243 (Gurjar *et al.*, 2009) correspondientes a las razas 1, 2 y 4. Para el gen *mtSSU*, se utilizaron las accesiones KJ720575, KJ720576 y

KJ720577 (Soren *et al.*, 2014) que no fueron identificadas en alguna raza en particular de *Foc*; las secuencias IGS rDNA se compararon con las accesiones: KF061171, KF061175 y KF061191 (Priyanka *et al.*, 2013) y finalmente para NIR no se encontraron secuencias de *Foc* para utilizarlas como referencia en el análisis filogenético.

Los análisis filogenéticos fueron muy variables para cada gen analizado. El gen *TEF* permitió separar a los aislamientos en dos clados. El primero agrupó a los aislamientos del Bajío y a las accesiones FJ538240, FJ538241 y FJ538243 (Gurjar *et al.*, 2009), AF346503 (Jiménez *et al.*, 2002) y FJ538243 (Gurjar *et al.*, 2009) correspondientes a las razas 1, 2 y 4 y en el segundo, a las razas de *Foc* (Figura 3). Estas diferencias y similitudes se pueden deber al origen geográfico de dichos aislamientos, ya que para el caso de las razas de *Foc* todos presentan el mismo origen geográfico y filogenético. Sin embargo, existen similitudes entre los aislamientos de Gurjar *et al.* (2009) y Jiménez *et al.* (2002) aun cuando estos son de la India y de España respectivamente.

El análisis de las secuencias de *mtSSU* muestra que todos los aislamientos presentan el mismo origen filogenético. Sin embargo, el aislamiento GVS44 (causante de amarillamiento) presenta mayor similitud con las razas de *Foc* y las accesiones KJ720575, KJ720576 y KJ720577 (Soren *et al.* 2014), de la India. La región ITS agrupó a los aislamientos en 2 clados en donde las razas de *Foc* y los aislamientos de Bajío presentan el mismo origen filogenético, al igual que el aislamiento KJ000583 de la raza 0 (Jiménez y Jiménez, 2003), mientras que las accesiones: AF491870, AF491869 y KJ000584 de Jiménez y Jiménez (2003) y Valverde *et al.* (2015), se agruparon en un segundo clado. Con lo que respecta a la región IGS, los aislamientos se agruparon en dos clados que sugieren su origen, en donde la raza 5 se ubicó con los aislamientos del Bajío (GVa60 y GSa58) y el resto se ubicaron un segundo origen. En el GenBank, no se encontraron

accesiones del gen NIR para *Foc*. Es por ello que solo se utilizaron los materiales de las razas y del Bajío, en donde todos presentaron el mismo origen filogenético; sin embargo, el aislamiento GSa58 presenta mayor similitud con las razas 1, 2, 3, 4, y 5 de *Foc* (Figura 3).

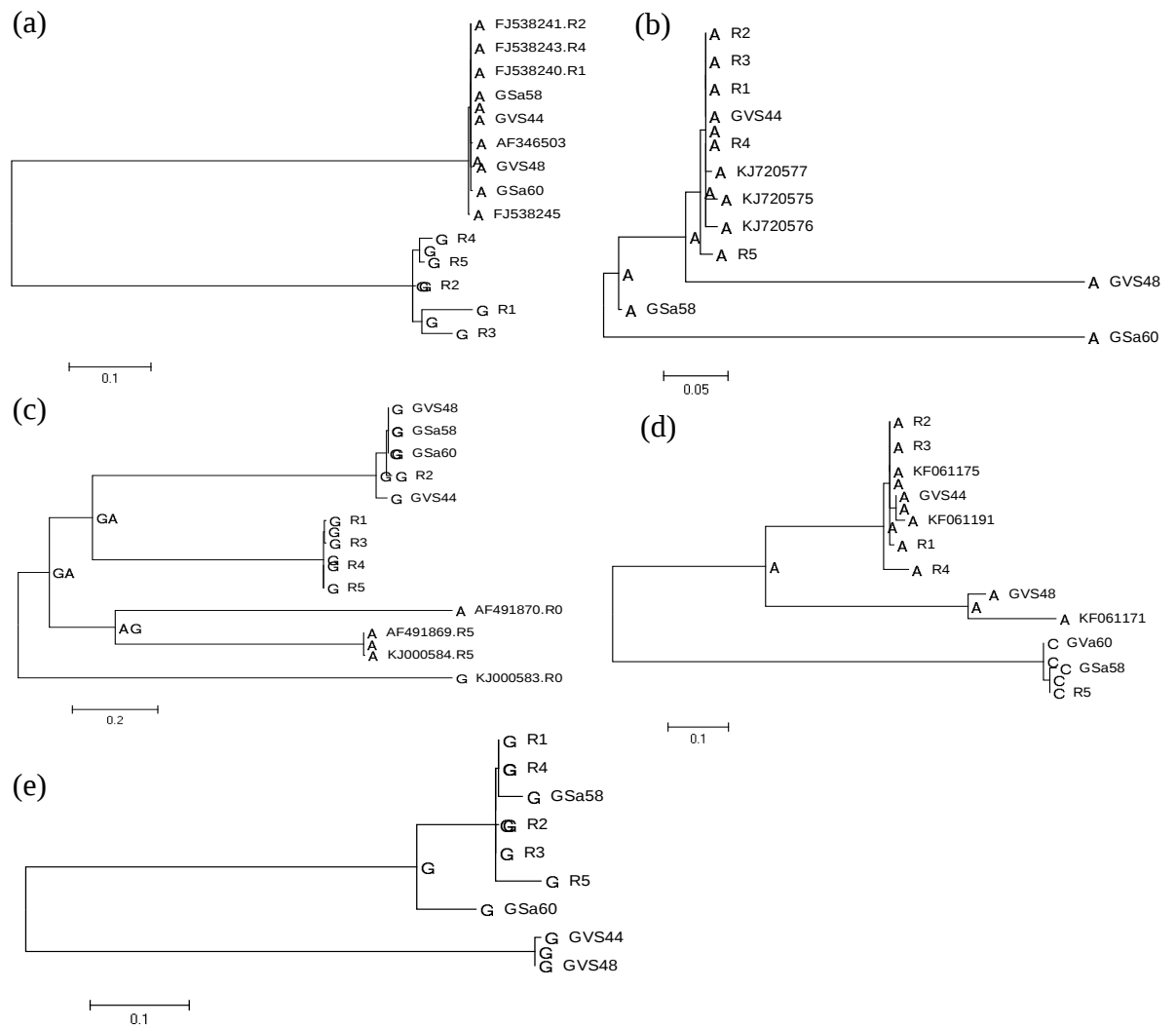


Figura 3. Análisis filogenético de las cinco razas de *Foc*, cuatro aislamientos del Bajío y accesiones del Genbank relacionados, para los genes TEF (a), mtSSU (b), ITS (c), IGS rDNA (d) y NIR (e). La misma letra que se observan en los filogramas representa el mismo origen. Datos obtenidos por el método de Maximum Likelihood basado en el modelo de Tamura-Nei (1).

El desarrollo del micelio y tipo de pigmentación en las cepas son caracteres que en años anteriores se empleaban para la identificación de este género; sin embargo, la coloración y desarrollo del micelio de los aislamientos empleados no fueron características que permitieron relacionarse en los agrupamientos de los análisis filogenéticos del presente estudio. Los resultados obtenidos demuestran que el origen geográfico no define las similitudes y/ o diferencias genéticas identificadas y tampoco las características del micelio de los aislamientos empleados en el presente estudio.

Las diferencias identificadas en los análisis filogenéticos de los genes utilizados en el presente estudio se pueden deber a las características propias de los genes, ya que son porciones ricas en intrones (Geiser, 2003). Estas regiones genéticas tienden a evolucionar a una velocidad mayor y esto ha sido observado a nivel de especie; uno de los marcadores mayormente utilizados es la región ITS (O'Donnell *et al.* 1998a; O'Donnell, 2000). A su vez, TEF es considerado como el gen esencial en análisis multigénicos por las siguientes razones: 1) la presencia de una única copia en el genoma de *Fusarium*; 2) no presenta copias ortólogas; 3) su riqueza en regiones intrónicas y alto nivel de polimorfismo entre especies estrechamente cercanas y, 4) la posibilidad de generar primers universales que permiten estudios a través de los límites filogenéticos del género (Geiser *et al.*, 2004; O'Donnell *et al.*, 2004). Además, la gran utilidad de TEF se basa en que cerca del 6 % de los nucleótidos que lo conforman son considerados cladísticamente significativos (39/ 656 nucleótidos), ya que el 95 % de estos nucleótidos se encuentran en regiones exónicas, en donde se han detectado procesos de transición de bases, lo que genera un 50 % más de información que otros genes usados en *Fusarium*, tal como mtSSU, β -tubulina y Calmodulina. Por ellos se considera que TEF posee un mayor nivel de confianza y utilidad (Geiser *et al.*, 2004). Sobre la base de lo anterior, el gen TEF ha estado bajo pocas

restricciones evolutivas, como se deduce de los patrones de mutación que incluyen delecciones de bases (O'Donnell *et al.*, 1998; Kristensen *et al.*, 2005). Además, varias de estas especies se refirieron como polifiléticas (Geiser *et al.*, 2004). Este hecho explica que aislamientos que pertenecen a una misma especie de *F. oxysporum* pueden tener grandes diferencias genéticas, producto de orígenes filogenéticos diferentes (O'Donnell *et al.*, 2008; Balajee *et al.*, 2009). Es posible que algunos de los aislamientos de *Foc* obtenidos en este estudio provengan de linajes diferentes, lo que explicaría las diferencias en los análisis filogenéticos, haciendo difícil su interpretación. Los genes que codifican estas proteínas se encuentran proximales a los elementos transponibles que juegan un papel clave en la aparición de nuevos rasgos de virulencia en muchos otros patógenos de las plantas (Schmidt *et al.*, 2013).

Los resultados de este estudio revelan similitudes y diferencias en el genoma nuclear de los aislamientos de garbanzo de la región del Bajío y las razas de *Foc*, lo cual está vinculado a nivel de genes y a la conservación de los mismos, así como a porciones de inserciones similares que parecen estar relacionadas. A pesar de eso, la variación en las secuencias puede deberse principalmente a la incorporación de bases en intrones y regiones intergenicas. Las diferencias identificadas en los arboles filogenéticos de genes sugieren eventos de selección parcial y/ o recombinación en el genoma nuclear, potencialmente ligados a eventos de hibridación (Gerda *et al.*, 2013).

Las mutaciones así como la transferencia horizontal pueden generar variación individual en una especie, y esta variación es distribuida y/ o acumulada a través de la recombinación sexual o parasexual. Esto ha sido generalmente asumido en este ascomiceto asexual *F. oxysporum* (Hirano y Arie, 2009). Baayen *et al.*, 2000, identificaron que las formas especiales *lilii*, *tulipae*, *cucumerinum*, *lagenariae* y *niveum* tienen origen monofilético,

mientras que otras formas como *cubense*, *melonias*, *asparagi*, *dianthi*, *gladioli*, *lini* y *lycopersici*, han revelado que tienen origen evolutivo múltiple. Estos descubrimientos nos llevan a la pregunta de cómo los aislamientos con diferentes orígenes han adquirido patogenicidad para el mismo hospedante.

Otras formas especiales, han sido reportadas como monofileticas y la relación genética estrecha entre las razas de *Foc* ha llevado a la hipótesis de que éstas se obtuvieron en un proceso gradual en lugar de una evolución de forma independiente (Gordon y Martyn, 1997). A pesar de que esta es una hipótesis razonable, la falta de resolución filogenética con formas especiales monofileticas hace difícil analizar las vías de evolución de la variación del patógeno, y este conocimiento no ha sido probado. Las formas especiales que causan daño en el cultivo de garbanzo como *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, exhiben una amplia variación patogénica aun cuando se ha considerado que son de origen monofiletico (Jiménez y Jiménez, 2002).

2.4 Conclusiones

Los aislamientos GVS44 y GVS48 identificados como *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* causantes de marchitez de plantas de garbanzo de la región del Bajío, mostraron un amplicón que los relaciona con la raza 5; sin embargo, este mismo fragmento fue amplificado también en las razas 1, 2, 3 y 4 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*.

Los análisis filogenéticos con los diferentes genes mostraron resultados variables al compararlos con las cinco razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* y las accesiones de referencia para esta misma especie. El gen TEF agrupó a todas las razas de *Foc* en un clado con el mismo origen, mientras que los aislamientos del Bajío y las accesiones de referencia se ubicaron en un segundo clado. El gen mtSSU indicó que todos los

aislamientos presentaron el mismo origen filogenético al igual que el gen NIR. La región ITS definió dos clados, en el primero se ubicaron las accesiones de la raza 0 y 5 y en el segundo el resto de los aislamientos. IGS también ubicó a los aislamientos en clados y en dos orígenes filogenéticos, en donde la raza 5 y los aislamientos GSa58 y GSa60 compartieron el mismo origen y el resto un segundo origen.

Nuestros resultados indican que los cuatro aislamientos GVS44 (marchitez), GVS48, GSa58 y GSa60 no pertenecen a las razas descritas para *Foc* pero presentan patotipos muy similares a los causados por éstas. Por lo tanto, este análisis sugiere que las razas de *Foc* involucran la acumulación escalonada y posiblemente la pérdida ocasional de virulencia.

2.5 Literatura citada

- Arvayo O., R., M., M. Esqueda., E. Acedo F., A. Sánchez and A. Gutiérrez. 2011. Morphological Variability and Races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* Associated with Chickpea (*Cicer arietinum*) Crops. American Journal of Agricultural and Biological Sciences 6: 114-121.
- Baayen R., P., K. O'Donnell., J. M. Bonants P., E. Cigelnik, N. M. Kroon L., P., J. A. Roebroek E., C. Waalwijk. 2000. Gene genealogies and AFLP analyses within the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and non-monophyletic *formae specialis* causing wilt and rot disease. Phytopathology 90: 891-900.
- Baayen R., P., K. O'Donnell., S. Breeuwsma., M. Geiser D., C. Waalwijk. 2001. Molecular relationships of fungi within the *Fusarium redolens*-*F. hostae* clade. Phytopathology 91: 1037–1044.
- Balajee S, A. Borman., M. Brandt., J. Cano., M. Cuenca E., E. Dannaoui., et al. 2009. Sequence-Based Identification of Aspergillus, Fusarium, and Mucorales Species

- in the Clinical Mycology Laboratory: Where Are We and Where Should We Go from Here? *Journal of Clinical Microbiology* 47: 877–884.
- Bao J., R., D. Fravel R., N. O'Neill R., G. Lazarovits., V. Berkum P. 2002. Genetic analysis of pathogenic and non-pathogenic *Fusarium oxysporum* from tomato plant. *Canadian Journal of Botany* 80: 271-279.
- FAOSTAT. 2015. Agricultural production. <http://www.faostat.fao.org/>
- Geiser D., M. 2003. Practical molecular taxonomy of fungi. In: Lange L and Tkacz J (eds) *Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Medicine and Agriculture*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. Pp 3-14.
- Geiser D., M., Jiménez G., M., Mar., S. Kang., I. Makalowska., N. Veeraraghavan., W. Todd J., N. Zhang., K. Gretchen A., K. O'Donnell. 2004. FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology* 110: 473–479.
- Gerda F., N., A., V. Merwe., B. D. Wingfield., M. Bogale, B. Tudzynski., M. J. Wingfield., and E.T. Steenkamp. 2013. Evidence for inter-specific recombination among the mitochondrial genomes of *Fusarium* species in the *Gibberella fujikuroi* complex. *BMC Genomics* 14: 605.
- Gordon T., R., and D. Martyn R. 1997. The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. *Annual Review of Phytopathology* 35:111-128.
- Gurjar G., M. Barve., A. Giri., V. Gupta. 2009. Identification of Indian pathogenic races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* with gene specific, ITS and random markers. *Mycologia* 101: 480–491.
- Harris L., J., E. Desjardins A., D. Plattner R., P. Nicholson, G. Butler, C. Young J., G. Weston., H. Proctor R., M. Hohn T. 1999. Possible role of trichothecene

- mycotoxins in virulence of *Fusarium graminearum* on maize. *Plant Disease* 83:954–960.
- Haware M., P., L. Nene Y. 1982. Races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. *Plant Disease* 66:809–810.
- Hirano Y., y Arie T. 2009. Variation and phylogeny of *Fusarium oxysporum* isolates based on nucleotide sequences of polygalacturonase genes. *Microbes and Environments Journal* 24: 113-120.
- Jiménez F., D., A. Navas C., J., M. Montes B., M. Jiménez D., R., and B. Landa B. 2011. Molecular and pathogenic characterization of *Fusarium redolens*, a new causal agent of Fusarium yellows in chickpea. *Plant Disease* 95: 860-870.
- Jiménez G., M., M., and R. M. Jiménez D. 2003. Development of a specific PCR-based assay for the identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and its pathogenic races 0, 1A, 5, and 6. *Phytopathology* 93: 200-209.
- Jiménez G., M., M., E. Pérez A., R. M. Jiménez D. 2001. Identification of pathogenic races 0, 1B/C, 5, and 6 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* with random amplified polymorphic DNA (RAPD). *European Journal of Plant Pathology* 107: 237–248.
- Jimenez G., M., M., G. Milgroom M., and R. M. Jimenez D. 2002. Gene genealogies support *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* as a monophyletic group. *The Plant Pathology Journal*. 51: 72-77.
- Jiménez G., M., M., J. A. Navas C., R. M. Jiménez D. 2004. The *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*/*Cicer arietinum* pathosystem: a case study of the evolution of plant-pathogenic fungi into races and pathotypes. *International Microbiology* 7: 95–104.

- Kristensen R., M. Torp., B. Kosiak., A. Holst J. 2005. Phylogeny and toxigenic potential is correlated in *Fusarium* species as revealed by partial translation elongation factor 1- α gene sequences. *Mycological Research* 109: 173–86.
- Langevin F., F. Eudes, A. Comeau. 2004. The effect of trichothecenes produced by *Fusarium graminearum* during *Fusarium* head blight development in six cereal species. *European Journal of Plant Pathology* 110: 735–746.
- Lievens B., Rep M., B. P. Thomma H., J. 2008. Recent developments in the molecular discrimination of *formae speciales* of *Fusarium oxysporum*. *Pest Management Science* 64: 781–788.
- López L. A. 2007. Diferenciación de formas especiales de *Fusarium oxysporum* con marcadores genético-moleculares y pruebas de patogenicidad. Tesis. Maestría en Protección Vegetal. Universidad Autónoma Chapingo.
- López L., A., E. Valadez M., L. X. Zelaya M., N. Marban M., H. V. Silva R. 2008. *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* and *Giberella fujikuroi* species complex causing wilting and yellowing in *Cicer arietinum*. *Journal of Plant Pathology* 90: 84.
- Luna P. A., H. V. Silva R., N. Marbán M., y E. Valadez M. 2004. Variabilidad genética de *Fusarium oxysporum* Schlechtend.:FR. F. sp. *ciceris* (Padwick) Matuo y K. Sato mediante PCR-RAPD'S en el Bajío México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22: 1(44-51).
- Medina M., C., G. M. Beltran R., A. López L., L. X. Zelaya M., E. Valadez M. 2014. Characterization and Identification of *Fusarium* Species Complexes Affecting Chickpea with Total Protein Profiles, TEF Gen. *Annual Research & Review in Biology* 4(23): 3513-3523.

- Murray M., G. and W. F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight DNA. *Nucleic Acids Research* 8: 4321-4325.
- Nimbalkara S., B., M. Harsulkara A., A. Giria P., M. Sainania N., V. Franceschib, V. Gupta S. 2006. Differentially expressed gene transcripts in roots of resistant and susceptible chickpea plant (*Cicer arietinum* L.) upon *Fusarium oxysporum* infection. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 68: 176–188.
- Nitschke E., M. Nihlgard., and M. Varrelmann. 2009. Differentiation of eleven *Fusarium* spp. isolated from sugar beet, using restriction fragment analysis of a polymerase chain reaction–amplified translation elongation factor 1 α gene fragment. *Phytopathology* 99: 921-929.
- O'Donnell K, Cigelnik E., and Nirenberg H., I. 1998a. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90: 465–493.
- O'Donnell K., C. Kistler H., E. Cigelnik., C. Ploetz R. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondria1 gene genealogies. *Proceedings of the Natinal Academy of Sciences USA* 95: 2044-2049.
- O'Donnell K, D. Sutton., A. Fothergill., D. McCarthy., M. RinaldiI, M. Brandt., et al. Molecular Phylogenetic Diversity, Multilocus Haplotype Nomenclature, and In Vitro Antifungal Resistance within the *Fusarium solani* Species Complex. 2008. *Journal of Clinical Microbiology* 46:2477-2490.
- O'Donnell K., C. Kistler H., K. Tacke B., H. Casper H. 2000. Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of

- Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. Proceedings of the Natinal Academy of Sciences USA 97: 7905–7910.
- O'Donnell K. 1993. *Fusarium* and its near relatives, p 225-233. In D. R. Reynolds and J. W. Taylor (ed.). The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics. CAB International, Wallingford, United Kingdom.
- O'Donnell K., T. J. Ward., D. M. Geiser., H. C. Kistler., T. Aoki. 2004. Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. Fungal genetics and biology 41: 6: 600-623.
- Rojas T., A. J. Rondón. 1995. Control químico *in vitro* de *Fusarium decemcellulare* Brick aislado de mango. Agronomía Tropical 45(3): 417-428.
- Schmidt S., M., M. Houterman P., Ma. Schreiver I., L. Amyotte S., B. Chellappan., S. Boeren., L. Takken F. M. Rep. 2013. MITEs in the promoters of effector genes allow prediction of novel virulence genes in *Fusarium oxysporum*. BMC Genomics 14:119.
- Singh B., P., R. Saikia., M. Yadav., R. Singh., S. Chauhan V., K. Arora D. 2006. Molecular characterization of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* causing wilt of chickpea. African Journal of Biotechnology 5: 497-502.
- Skovgaard K, I. Nirenberg H., K. O'Donnell., S. Rosendahl. 2001. Evolution of *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* races inferred from multigene genealogies. Phytopathology 91: 1231–1237.

- Tamura K., Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10: 512-526.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
- Velarde F., S., P. F. Ortega M., G. A. Fierros L., I. Padilla V., E. Gutiérrez P., F. G. Rodríguez C., J. A. López V., J. A. Acosta G., y J. A. Garzón T. 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. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 6: 4.
- White T., J., T. Bruns., S. Lee., J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M. A. Gelfand., D. H. Sninsky., J. J. White (eds). *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego pp. 315–322.

Capítulo III. Relación filogenética de aislados de *Fusarium* obtenidos de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) de la zona del Bajío, México

Resumen

Fusarium es un grupo importante dentro de los hongos fitopatógenos causantes de daño en muchos cultivos agrícolas y debido a su amplia diversidad ha presentado limitantes para su taxonomía. El análisis filogenético ha permitido proponer un nuevo sistema taxonómico basado en el concepto de especie filogenética. En el presente estudio se analizaron y compararon secuencias de los genes y regiones TEF, ITS y mtSSU de 37 aislamientos de *Fusarium* provenientes de plantas de garbanzo con síntomas de Fusariosis de la región del Bajío, México. El análisis permitió identificar que los aislamientos están asociados a los complejos de especies de *F. oxysporum*, *Gibberella fujikuroi*, *F. incarnatum-equiseti* y *F. solani*. Por tanto, los patotipos de amarillamiento y marchitez en garbanzo de la región del Bajío muestreada, están asociados a los cuatro complejos de especies de *Fusarium* antes mencionados.

Palabras clave: Secuenciación, filogenia, haplotipo, complejos de especies

3.1 Introducción

Las especies del género *Fusarium* son conocidos como patógenos de plantas y productores de toxinas asociados a la muerte de animales y humanos (Watanabe, 2011). Representan el grupo más importante de hongos fitopatógenos capaces de dañar a los cultivos durante cualquier etapa de desarrollo (Ma, 2010). Sin embargo, el estudio del género ha sido difícil, debido a que cepas con morfología similar muestran diferencias considerables a nivel de DNA, lo cual ha limitado establecer un sistema taxonómico adecuado (Geiser *et al.*, 2004; Chandra *et al.*, 2011).

Recientemente, se han realizado análisis filogenéticos para examinar la taxonomía de especies de

Fusarium y se ha propuesto un nuevo sistema basado en el concepto de especie filogenética, el cual se define como organismos con características diagnósticas diferentes a las de otros grupos similares y que además exhiben un patrón de ancestro y descendencia Watanabe (2011). O'Donnell *et al.* (1998a, 1998b) estudiaron múltiples genes o porciones de ellos con los que estimaron la relación genética de diferentes especies de *Fusarium*, demostrando que este representa complejos de especies que comprenden una colección de varios linajes clonales.

En la actualidad, las técnicas más informativas empleadas para el diagnóstico de hongos es la secuenciación de DNA (Baayen *et al.*, 2001). El gen TEF (por sus siglas en inglés, Factor 1- α de extensión y traducción) se ha convertido en el marcador de elección, como una herramienta de identificación de locus único en *Fusarium*; además, este marcador ha demostrado ser altamente informativo para relacionar desde el punto de vista genético aquellos hongos que comparten similitudes y por sí solo puede ser suficiente para resolver relaciones filogenéticas, Además, se ha utilizado entre los organismos de una misma especie o de un mismo género para conocer el parentesco entre ellos (Geiser *et al.*, 2004). El gen TEF fue identificado como una región para estudios filogenéticos y taxonómicos en *Fusarium* spp. permitiendo diferenciar especies (Baayen *et al.*, 2000, 2001; O'Donnell *et al.*, 2000b; Skovgaard *et al.*, 2001).

La región ITS (por sus siglas en inglés, espacio transcrito interno) también ha sido considerado como un marcador para la identificación de especies en diferentes organismos, entre ellos los hongos, debido a que es una región altamente conservada (O'Donnell, 1992). El gen mtSSU (por sus siglas en inglés, subunidad pequeña mitocondrial del RNA ribosomal) ha sido empleado para evaluar distintas especies (Baayen *et al.*, 2000, 2001 O'Donnell *et al.*, 2000) ayudando a elucidar la relación evolutiva con varias formas especiales de *F. oxysporum* (O'Donnell *et al.*, 1998).

F. oxysporum (*Fo*) es un hongo ampliamente distribuido y se ha reportado que afecta a diferentes

cultivos de diferentes especies, entre ellos a garbanzo (Jiménez *et al.*, 2015). Fo ocasiona pérdidas que fluctúan del 10 al 60% del rendimiento en el cultivo de garbanzo en México (Sosa, 2012). Sin embargo, existe escasa información referente a su identificación en México, lo que repercute en el mejor manejo de este cultivo.

Luna *et al.*, (2004) aisló y analizó 41 cepas de *Fusarium* de plantas de garbanzo con síntomas de amarillamiento y marchitez (fusariosis) en la región del Bajío, México, y observó amplia variabilidad genética, lo que sugirió que podrían pertenecer a diferentes grupos. Sin embargo, éstos no fueron identificados molecularmente en ese momento. Es por lo anterior que en este trabajo se realizó el análisis de las secuencias de TEF, ITS y mtSSU de 37 aislamientos para identificar a las especies o complejos a los cuales están asociados dichos aislamientos.

3.2 Materiales y métodos

Se utilizaron 37 aislamientos monospóricos de *Fusarium*, provenientes del Bajío (Guanajuato y Michoacán) México, de plantas de garbanzo con síntomas de marchitez y amarillamiento (Luna *et al.*, 2004) (Cuadro 1). Se activaron en medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) en cajas Petri a 25 °C.

Extracción de DNA. Ésta se realizó de acuerdo a Bainbridge *et al.*, (1990). La calidad del DNA se determinó por electroforesis en gel de agarosa 0.8%. El gel fue teñido con bromuro de etidio $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y visualizado con la cámara Kodak Digital Science 1D 2.0.

Cuadro 1. Aislamientos de *Fusarium* provenientes de plantas de garbanzo (*Cicer arietinum*)

Clave de aislamiento	Localidad	Estado	Sintomatología en garbanzo	Número de accesión en el NCBI		Haplotipo basados en secuencias		Complejo de especie al que pertenece
				TEF	ITS	TEF	ITS	
MC3	El Calvario	Michoacán	Amarillamiento	KC113012	NR	9		FOSC
MS6	Singuio	Michoacán	Amarillamiento	KC113013	NR	11		FOSC
MS8	Singuio	Michoacán	Amarillamiento	EU091041	EU091033	5	5	FOSC
MS9	Singuio	Michoacán	Amarillamiento	EU091042	EU124521	6	6	FOSC
MS10	Singuio	Michoacán	Amarillamiento	EU091043	EU091001	6	6	FOSC
MP14	La Purísima	Michoacán	Amarillamiento	EU091073	EU091036	2	2	FIESC
MP16	La Purísima	Michoacán	Amarillamiento	KC113037	EU091035	2	2	FIESC
MI19	INIFAP	Michoacán	Marchitez	KC113030	NR	12		FOSC
MM23	Morelia	Michoacán	Marchitez	EU091047	EU091006	11	6	FOSC
MM25	Morelia	Michoacán	Amarillamiento	EU091072	EU091039	1	1	GFC
MM28	Morelia	Michoacán	Amarillamiento	KC113017	NR	11		FOSC
MM30	Morelia	Michoacán	Amarillamiento	KC113019	EU091007	9	6	FOSC
MCU35	Cuitzeo	Michoacán	Amarillamiento	EU091050	EU091009	12	6	FOSC
MCU38	Cuitzeo	Michoacán	Amarillamiento	EU091052	EU091012	12	6	FOSC
GP41	Puquichapio	Guanajuato	Amarillamiento	EU091053	EU091013	10	6	FOSC
GP42	Puquichapio	Guanajuato	Amarillamiento	EU091054	EU091014	9	6	FOSC
GP43	Puquichapio	Guanajuato	Amarillamiento	EU091055	EU091015	9	6	FOSC
GVS45	Valle de Stg.	Guanajuato	Marchitez	KC113032	EU091016	12	4	FOSC
GVS48	Valle de Stg.	Guanajuato	Marchitez	EU091058	EU091018	13	6	FOSC
GyrB52	Yuriria	Guanajuato	Marchitez	KC113022	NR	9		FOSC
GyrB55	Yuriria	Guanajuato	Marchitez	EU091060	EU091021	10	6	FOSC
GSa61	Salvatierra	Guanajuato	Marchitez	KC113041	NR	14		FOSC
GSa62	Salvatierra	Guanajuato	Marchitez	EU091064	EU091026	12	6	FOSC
GSa64	Salvatierra	Guanajuato	Asintomático	KC113039	NR	3		FSSC
GSa65	Salvatierra	Guanajuato	Asintomático	EU091070	EU091037	3	3	FSSC
GCL66	Celaya	Guanajuato	Marchitez	KC113027	EU091027	5	5	FOSC
GCL67	Celaya	Guanajuato	Marchitez	EU091065	EU091028	4	4	FOSC
GCL68	Celaya	Guanajuato	Marchitez	EU091066	NR	8		FOSC
GJP69	Jaral del P.	Guanajuato	Marchitez	EU091071	EU091038	3	3	FOSC
GIp70	Irapuato	Guanajuato	Marchitez	KC113026	NR	9		FOSC
GIp71	Irapuato	Guanajuato	Marchitez	EU091067	EU091030	12	6	FOSC
GIp72	Irapuato	Guanajuato	Marchitez	EU091068	EU124523	5	5	FOSC
GJR73	Juventino R.	Guanajuato	Marchitez	KC113029	EU091031	12	6	FOSC
GVg74	Villagrán	Guanajuato	Marchitez	EU091069	EU091032	5		FOSC
GAG75	Apaseo el G.	Guanajuato	Marchitez	KC113028	NR	6		FOSC
GCz76	Cortazar	Guanajuato	Marchitez	KC113036	NR	7		FOSC
GYr77	Yuriria	Guanajuato	Marchitez	KC113025	NR	9		FOSC

ITS: Espacio transcrito interno

TEF: Factor 1 α de extensión y traducción

NCBI: Centro Nacional de Información en Biotecnología

NR: no reportado

FIESC: Complejo de especies de *Fusarium incarnatum-equiseti*

FOSC: Complejo de especies de *Fusarium oxysporum*

GFC: Complejo de especies de *Gibberella fujikuroi*

FSSC: Complejo de especies de *Fusarium solani*

Amplificación y secuenciación de TEF, ITS y mtSSU. El gen TEF ($\approx$ 800 pb) fue amplificado

con los primers: EF-1 (5' ATGGGTAAGGARGACAAGAC3') y EF-2

(5' GGARGTACCAGRSATCTCATG3') (O'Donnell *et al.*, 1998a), la región ITS ($\approx$ 1000 pb) con:

ITS-5HP (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGC3') y NL4 (5'GGTCCGTGTTTCAAGACGG3') (White *et al.*, 1990; O'Donnell, 1993) y mtSSU ($\approx$ 700 pb) con: MS1 (5'CAGCAGTCAAGAATATTAGTCA3') y MS2 (5'GCGGATTATCGAATTAAATAAC3') (White *et al.*, 1990). La mezcla de reacción fue preparada en un volumen de 25 μ L conteniendo 200 μ M de cada dNTP, 1.5 U de *Taq* DNA polimerasa, 1X de amortiguador *Taq*, 1.5 mM de $MgCl_2$, 20 pmoles de cada primer y 100 ng de DNA. Los parámetros de PCR para el gen TEF fueron: un ciclo de 94°C, 3 min, seguido de 40 ciclos [94°C, 30 s; 62°C, 30 s; 72°C, 1.5 min] y 72°C durante 2.5 min de extensión final. Para la región ITS: un ciclo de 94°C, 3 min, seguido de 35 ciclos [95°C, 1 min; 58°C, 1 min; 72°C, 2 min] y 72°C por 10 min de extensión final. Para el gen mtSSU: un ciclo de 95°C, 1.5 min, seguido de 35 ciclos [94°C, 30 seg; 52°C, 30 seg; 72°C, 1.5 min] y 72°C por 10 min de extensión final. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 *Applied Biosystems*. Los productos fueron verificados en gel de agarosa 1.2 %. Posteriormente los amplicones fueron secuenciados en un equipo 3130/Genetic Analyzers de *Applied Biosystems*. Todas las secuencias se encuentran disponibles en el banco de genes del NCBI (Cuadro 1).

Análisis filogenético. Para el análisis filogenético se utilizaron las secuencias de TEF, ITS y mtSSU, las cuales se editaron con el programa BioEdit y se alinearon en el programa ClustalW. Se utilizaron secuencias reportadas pertenecientes a los complejos de especies de *F. oxysporum* (FOSC), *Gibberella fujikuroi* (GFC), *F. incarnatum-equiseti* (FIESC) y *F. solani* (FSSC). Se utilizó el método de máxima parsimonia mediante el programa PAUP (*Phylogenetic Analysis Using Parsimony*) ver.4.0b10 software (Swofford, 2001). En el análisis todos los caracteres se consideraron con el mismo valor. Un conjunto de los árboles más parsimoniosos se obtuvo mediante una búsqueda heurística de 1000 repeticiones con una adición de secuencias al azar, y

guardando 10 árboles de cada adición de secuencias al azar. La robustez de los clados fue estimada con *bootstrapping* de 1000 repeticiones. Para la identificación de haplotipos (H) definidos como el conjunto de alelos o secuencias de DNA que están muy cercanos, es decir, estrechamente ligados y que pueden considerarse como una única región de DNA (Appel y Gordon, 1995), los aislamientos de las secuencias de TEF e ITS fueron analizadas con el software Dambe (*Software package for extensive data analysis in molecular biology and evolution for Windows ME/2000*).

3.3 Resultados y discusión

Es importante conocer con precisión la identidad de *Fusarium* y su diversidad genética para el adecuado control de la enfermedad. El análisis de secuencias nos permitió identificar que los aislamientos asociados a la marchitez vascular del garbanzo en la región del Bajío, de plantas con síntomas de amarillamiento y marchitez, están asociados a complejos de especies de *Fusarium*.

3.3.1 Análisis filogenético con TEF

El análisis del fragmento de TEF (aproximadamente 800 pb) con el software Dambe, permitió identificar 14 haplotipos, los cuales representan a los aislamientos secuenciados en el presente estudio utilizados para el análisis filogenético. Éstos se agruparon en cuatro clados claramente definidos; estos clados a su vez corresponden a cuatro complejos de especies de *Fusarium*. El primer clado conformado por aislamientos que pertenecen al complejo FOSC y representantes de los haplotipos 4 al 14 (H4 al H14), nomenclatura definida por los autores, citado anteriormente. Al segundo clado pertenecen el complejo de GFC y al haplotipo 1 (H1), mientras que el tercer y cuarto clado se conforman por representantes del complejo de FIESC y el haplotipo 2 (H2) y por aislamientos del complejo FSSC y el haplotipo 3 (H3), respectivamente (Figura 1).

Los resultados mostraron que el gen TEF permitió resolver relaciones filogenéticas entre aislamientos de *Fusarium* de plantas de garbanzo con síntomas de fusariosis de la región del Bajío que mostraban los patotipos de amarillamiento y marchitez, característicos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. La información del gen TEF provee información suficiente para diferenciar entre aislamientos. Resultados filogenéticos con el gen TEF confirmaron la presencia de cuatro complejos de especies de *Fusarium* en la región del Bajío muestreada con *bootstrap* de 100 %. Lo anterior se corrobora con lo referido por O'Donnell *et al.* (1998a), en donde mencionan que TEF es un excelente marcador filogenético para resoluciones de complejos de *F. oxysporum*.

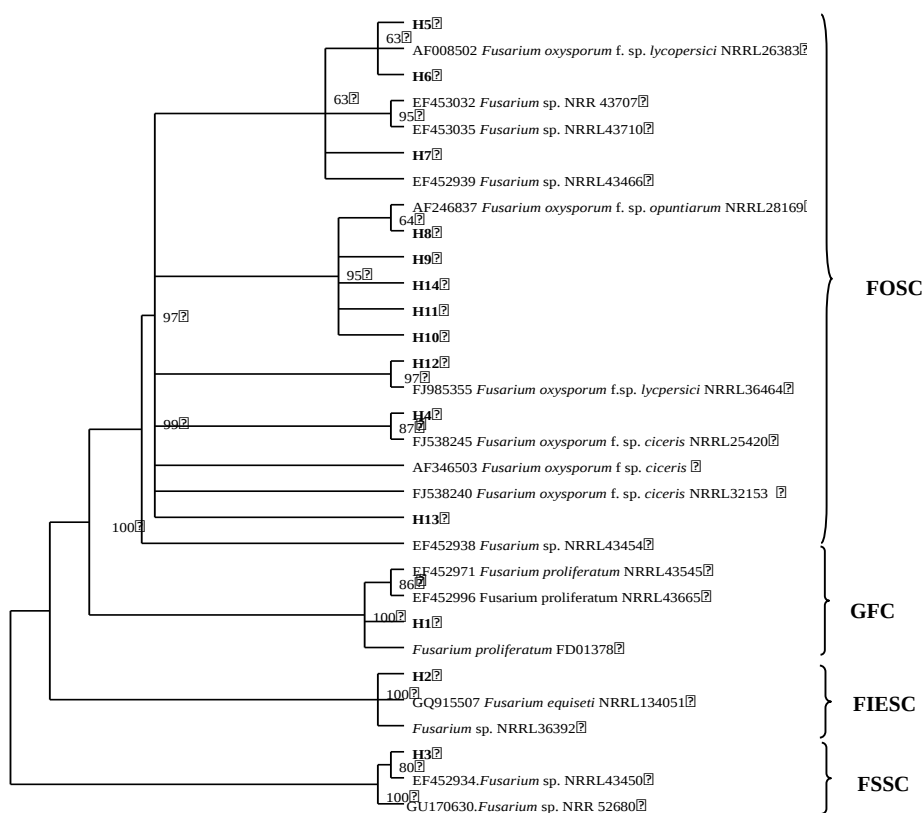


Figura 1. Filograma obtenido del análisis de máxima parsimonia de los haplotipos identificados con las secuencias del gen TEF de los aislados estudiados. Los números en cada brazo indican el soporte bootstrap (porcentaje) para cada cluster. FOSC= Complejo de especies de *Fusarium oxysporum*, GFC= Complejo de especies de *Gibberella fujikuroi*, FIESC= Complejo de especies de *Fusarium incarnatum-equiseti*, FSSC= Complejo de especies de *Fusarium solani*. H: haplotipo. El análisis se realizó usando el método de bootstrap (1000 repeticiones) en PAUP ver.4.0b10 software.

3.3.2 Análisis filogenético con ITS

La región ITS de aproximadamente 1000 pb, fue amplificado sólo para 24 aislamientos de los 37 utilizados en el presente estudio (Cuadro 1), debido a que no fue posible secuenciar a todos los aislamientos con las condiciones de PCR empleadas en el presente estudio. El análisis con el software Dambe permitió identificar a 6 haplotipos de los 24 aislamientos. El análisis filogenético agrupó a los haplotipos en cuatro clados que corresponden a los cuatro complejos de especies de *Fusarium*: FOSC, GFC, FIESC y FSSC (Figura 2). El clado 1 representado por aislamientos del complejo FOSC y los haplotipos 4 al 6 (H4 al H6); el clado 2 por representantes del complejo FIESC y el haplotipo 2 (H2); el tercer clado por aislamientos del complejo GFC y el haplotipo 1 (H1), y el cuarto clado por FSSC y el haplotipo 3 (H3).

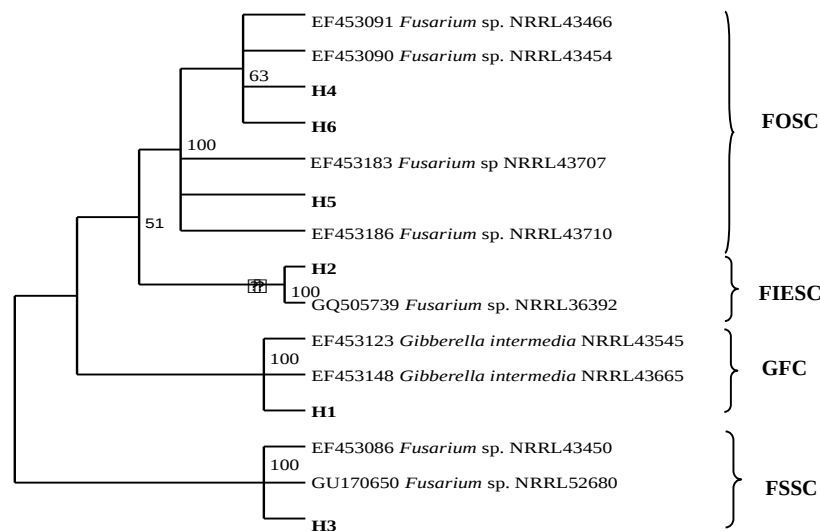


Figura 2. Filograma obtenido del análisis de máxima parsimonia de los haplotipos identificados con las secuencias de la región ITS de los aislados estudiados. Los números en cada brazo indican el soporte bootstrap (porcentaje) para cada cluster. FOSC= Complejo de especies de *Fusarium oxysporum*, GFC= Complejo de especies de *Gibberella fujikuroi*, FIESC= Complejo de especies de *Fusarium incarnatum-equiseti*, FSSC= Complejo de especies de *Fusarium solani*. H: haplotipo. El análisis se realizó usando el método de bootstrap (1000 repeticiones) en PAUP ver.4.0b10 software.

3.3.3 Análisis filogenético con mtSSU

El fragmento amplificado de la subunidad pequeña del RNA ribosomal fue de aproximadamente 700 pb. Para la elaboración del filograma se utilizaron secuencias representantes de los haplotipos identificados con las secuencias del gen TEF y la región ITS en el presente estudio (Cuadro 1). Se utilizaron secuencias reportados en el GenBank de los complejos de especies de *F. oxysporum*, *F. sonali* y *F. incarnatum-equiseti*. Sin embargo, no se encontraron reportes de secuencias del complejo de *G. fujikuroi*, en particular para la subunidad pequeña del ribosoma. El filograma realizado con las secuencias de la subunidad pequeña del ribosoma (Figura 3), muestra claramente la agrupación en los cuatro complejos antes descritos con las secuencias TEF e ITS.

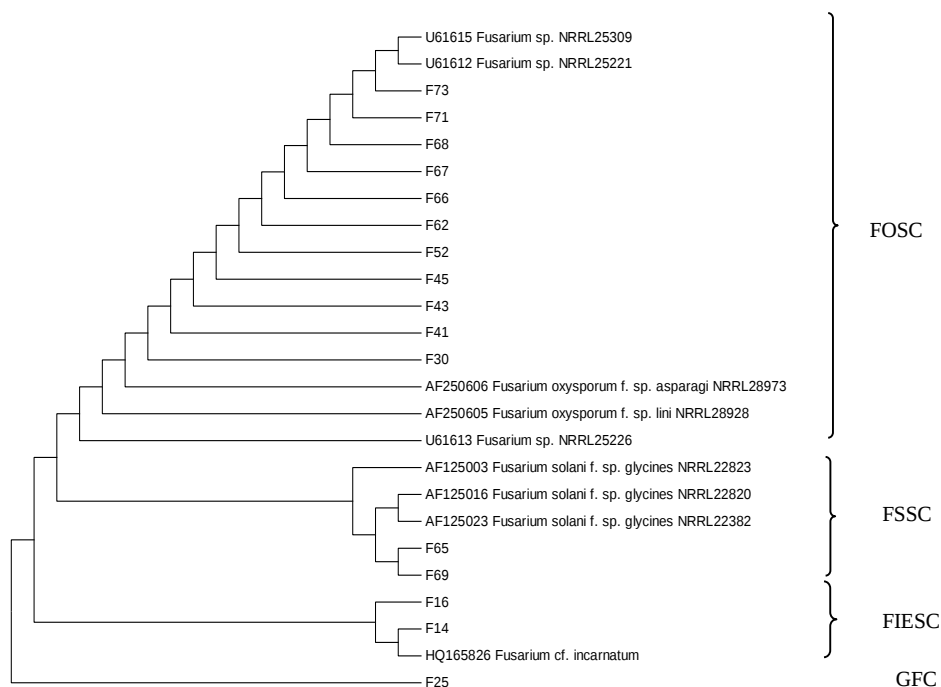


Figura 3. Filograma obtenido del análisis de máxima parsimonia con 16 secuencias del gen mtSSU de los aislados estudiados. FOSC= Complejo de especies de *Fusarium oxysporum*, GFC= Complejo de especies de *Gibberella fujikuroi*, FIESC= Complejo de especies de *Fusarium incarnatum-equiseti*, FSSC= Complejo de especies de *Fusarium solani*. H: haplotipo. El análisis se realizó usando el método de bootstrap (1000 repeticiones) con PAUP ver.4.0b10 software.

Las regiones ricas en intrones de genes que codifican proteínas, generalmente son considerados como marcadores favorables para análisis filogenéticos a nivel de especie en hongos, debido a que evolucionan a un ritmo mayor que la que se observa en la región ITS aunque sean altamente conservadas (Geiser *et al.*, 2004). En este trabajo fue posible establecer una correlación entre los tres filogramas, elaborados con TEF, ITS y mtSSU, permitiendo identificar a los aislamientos analizados y ubicarlos en los cuatro complejos de especies de *Fusarium* antes mencionados.

El análisis de los genes TEF, ITS y mtSSU permitieron definir que los 37 aislamientos pertenecen a los complejos de especies de *F. oxysporum*, *G. fujikuroi*, *F. incarnatum-equiseti* y *F. solani*. Este resultado demuestra que la fusariosis en garbanzo en la región del Bajío, está asociada a cuatro complejos de *Fusarium* y no a las razas de *Foc*, como se supuso al principio del estudio, y que son causantes de los patotipos de amarillamiento y marchitez. También, nuestros resultados permiten decir que las especies de *Fusarium*, que son altamente diversas y filogenéticamente distintas (Kristensen *et al.*, 2005), son capaces de producir síntomas parecidos entre las plantas hospedantes de este tipo de hongos.

Muchos autores han llegado a la conclusión de que para confirmar la identidad de especies del género de *Fusarium*, es recomendable el análisis de secuencias del gen TEF junto con genes que codifican proteínas ricas en intrones. El análisis filogenético de TEF ha permitido distinguir entre complejos de especies de *F. avenaceum*, *F. acuminatum*, *F. tricinctum*, *G. fujikuroi*, *F. solani*, *F. oxysporum* y *G. zae* (Geiser *et al.*, 2004; Kristensen *et al.*, 2005; Uhlig *et al.*, 2009). Varios hallazgos importantes relacionados con la filogenia y clasificación del complejo de *F. oxysporum*, identifican que este complejo es principalmente monofilético (e.g., *lilii*, *tulipae*, *cucumerinum*, *lagenariae* y *niveum*); sin embargo, muchas formas especiales son polifiléticos (e.g., *cubense*, *melonias*, *asparagi*, *dianthi*, *gladioli*, *lini* y *lycopersici*), lo que sugiere que la patogenicidad ha

evolucionado de manera convergente y que cada linaje clonal tiene propiedades patógenas únicas (O'Donnell *et al.*, 1998a). Esta característica ha dificultado el manejo de información sobre la diversidad genética de *Fusarium*, necesaria para los programas de mejoramiento eficaces y los esfuerzos para el control de esta enfermedad.

Por otra parte la sexualidad y parasexualidad que puede ocurrir en *F. oxysporum* (Leslie, 1993) también puede contribuir a la transferencia lateral de genes de patogenicidad a cepas lejanamente relacionadas, lo que complica también su identificación a nivel de especie. La difusión horizontal de los cromosomas que transfiere grupos de genes a través de distintos linajes evolutivos (Covert 1998), podría explicar también por qué la misma maquinaria de patogenicidad se produce en diferentes clados del complejo de especies de *Fusarium* (Baayen, 2000). Los análisis del gen TEF (López *et al.*, 2008) correlacionados con los análisis de perfiles de proteínas totales (Medina *et al.*, 2014), permitieron identificar que estos aislamientos pertenecen a complejos de *Fusarium*.

3.4 Conclusiones

El análisis filogenético de secuencias constituye una buena base para el diagnóstico molecular de especies y complejos de *Fusarium* en problemas de fusariosis en plantas de garbanzo.

El análisis de secuencias del gen TEF, ITS y mtSSU permitieron ubicar a los aislamientos en estudio en cuatro complejos de especies de *Fusarium*: *F. oxysporum*, *G. fujikuroi*, *F. incarnatum-equiseti* y *F. solani*, los cuales están involucrados en la enfermedad conocida como fusariosis en plantas de garbanzo. Asimismo los resultados obtenidos indican, también, que los patotipos característicos de amarillamiento y marchitez están asociados al menos a cuatro complejos de especies de *Fusarium*, antes mencionados y no solamente a las razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*.

3.5 Literatura citada

- Appel D., J., R. Gordon T. 1995. Intraspecific variation within populations of *Fusarium oxysporum* based on RFLP analysis of the intergenic spacer region of the rDNA. *Experimental Mycology* 19: 120-128.
- Baayen R., P., K. O'Donnell, S. Breeuwsma, M. Geiser D., C. Waalwijk. 2001. Molecular relationships of fungi within the *Fusarium redolens-F hostae* clade. *Phytopathology* 91: 1037–1044.
- Baayen R., P., K. O'Donnell., J. M. Bonants P., E. Cigelnik., N. M. Kroon L., P., J. A. Roebroek E., C. Waalwijk. 2000. Gene genealogies and AFLP analyses within the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and non-monophyletic *Formae specialis* causing wilt and rot disease. *Phytopathology* 90: 891–900.
- Bainbridge B., W., L. Spreadbury C., G. Scalise F., Cohen J. 1990. Improved methods for the preparation of high molecular weight DNA from large and small scale cultures of filamentous fungi. *FEMS Microbiology Letters* 66: 113-118.
- Chandra N., S., G. Wulff E., C. Udayashankar A., P. Nandini B., R. Niranjana S., N. Mortensen C., S. Prakash H. 2011. Prospects of molecular markers in *Fusarium* species diversity. *Applied Microbiology and Biotechnology* 90: 1625–1639.
- Covert S., F. 1998. Supernumerary chromosomes in filamentous fungi. *Current Genetics* 33: 311-319.
- Geiser D., M., M. Jiménez G., S. Kang., I. Makalowska., N. Veeraraghavan, T. Ward., N. Zhang, A. Kulda G., K. O'Donnell. 2004. FUSARIUM-ID v.1.0: a DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology* 110: 473–479.

- Jiménez D., R., M., P. Castillo., M. M. Jiménez G., B. Landa B., A. Navas C., J. 2015. *Fusarium* wilt of chickpeas: Biology, ecology and management. *Crop Protection* 73:16-27.
- Kristensen R., M. Torp., B. Kosiak., A. Holst J. 2005. Phylogeny and toxigenic potential is correlated in *Fusarium* species as revealed by partial translation factor 1 alpha gene sequences. *Mycological Research* 109: 173–186.
- Leslie J., F. 1993. Fungal vegetative compatibility. *Annual Review of Phytopathology* 31: 127-15.
- López L., A., E. Valadez M., L. X. Zelaya M., N. Marbán M., H. V. Silva R. 2008. *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, and *Giberella fujikuroi* species complexes causing wilting and yellowing in *Cicer arietinum*. *Journal of Plant Pathology* 90(S3):84.
- Luna P., A., H. V. Silva R., N. Marbán M., E. Valadez M. 2004. Variabilidad genética de *Fusarium oxysporum* Schlechtend.:FR. F. sp. *ciceris* (Padwick) Matuo y K. Sato mediante PCR-RAPD'S en el Bajío México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22: 44-51.
- Ma L., J., D. H. Charlotte V., A. Borkovich K., J. Coleman J., J. Daboussi M., D. Pietro A., M. Dufresne., *et al.* 2010. Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature* 464:367-373.
- Medina M., C., GM. Beltrán R., A. López L., LX. Zelaya M., E. Valadez M. 2014. Characterization and identification of *Fusarium* species complexes affecting chickpea with total protein profiles, EF-1 α gen. *Annual Research and Review in Biology* 4: 3513-3523.
- O'Donnell K, C. Kistler H., K. Tacke B., H. Casper H. 2000a. Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97: 7905–7910.
- O'Donnell K, E. Cigelnik., I. Nirenberg H. 1998b. Molecular systematics and phylogeography

- of the *Gibberella fujikuroi* species complex of *Fusarium*. *Mycologia* 90: 465-493.
- O'Donnell K, I. Nirenberg H., T. Aoki., Cigelnik E. 2000b. A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: detection of additional phylogenetically distinct species. *Mycoscience* 41: 61–78.
- O'Donnell K. 1992. Ribosomal DNA internal transcribed spacer are highly divergent in the phytopathogenic asco-mycete *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicaries*). *Current Genetics* 22: 213–220.
- O'Donnell K., C. Kistler H., E. Cigelnik., C. Ploetz R. 1998a. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95: 2044-2049.
- Skovgaard K, I. Nirenberg H., K. O'Donnell., S. Rosendahl. 2001. Evolution of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* races inferred from multigene genealogies. *Phytopathology* 91: 1231–1237.
- Sosa P., R. 2012. Métodos alternativos de control de rabia en el cultivo de garbanzo (microorganismos antagónicos). VIII Jornada del cultivo de garbanzo. Fundación Produce Sinaloa, A.C. pp. 25-34.
- Swofford D., L., J. Waddell P., P. Huelsenbeck J., G. Foster P., O. Lewis P., S. Rogers J. 2001. Bias in phylogenetic estimation and its relevance to the choice between parsimony and likelihood methods. *Systematic Biology* 50: 525-539.
- Uhlig S., L. Ivanova., D. Petersen., Kristensen R. 2009. Structural studies on minor enniatins from *Fusarium* sp. VI03441: novel N-methyl-threonine containing enniatins. *Toxicon* 53: 734–742.

- Watanabe M, Y. Takahiro., L. Ken-ichi., K. Susumu., Y. Hara K. Watanabe et al. 2011. Molecular phylogeny of the higher and lower taxonomy of the *Fusarium* genus and differences in the evolutionary histories of multiple genes. *BMC Evolutionary Biology* 11: 322.
- White T., J., T. Bruns., S. Lee., J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds), *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, pp. 315–322.

Capítulo IV. Patogenicidad de representantes del complejo de *Fusarium oxysporum* en cultivos de importancia económica para México

Resumen

El complejo de especies de *Fusarium oxysporum* (FOSC) comprende un grupo de hongos ascomicetos que han sido ampliamente estudiados debido a la habilidad que presentan para causar daño en plantas y humanos. Aislamientos de FOSC causan daños de marchitez vascular y daño en raíz en un amplio rango de hospedantes. Es por lo anterior que en este trabajo se evaluó el daño que causan representantes del complejo de especies de *Fusarium* en diferentes cultivos hortícolas para conocer e identificar la respuesta que inducen estos hongos en los cultivos. Se utilizaron cuatro aislamientos de FOSC, dos aislados de plantas de garbanzo y dos de chile manzano y se inocularon en seis cultivos (jitomate, calabaza, frijol, garbanzo, chile y maíz). Los aislamientos del complejo de especies de *F. oxysporum* presentaron diferentes tipos de daño al inocularlos en los seis cultivos y en donde el aislamiento GSV48 fue el más agresivo. Por lo anterior, es posible plantear que un solo aislamiento es capaz de causar daño en diferentes cultivos, aun cuando los aislamientos presentan diferentes orígenes geográficos y fueron aislados de diferentes hospedantes.

Palabras clave: inoculación, incidencia, severidad, amarillamiento, marchitez vascular

4.1 Introducción

Los miembros del complejo de especies de *Fusarium oxysporum* (FOSC) son patógenos del suelo, responsables de la marchitez vascular, daño de la raíz y *damping-off* de un amplio rango de cultivos. Es la especie más comúnmente encontrada y económicamente importante dentro del

género *Fusarium* (O'Donnell *et al.*, 2009). Recientes trabajos han propuesto que *F. oxysporum* representa un complejo de varias especies y que una sola de ellas puede causar daño en diferentes cultivos (O'Donnell *et al.*, 2008 y O'Donnell *et al.*, 2009). Los miembros de FOSC exhiben una compleja plasticidad genética, debido a que causan algunas de las enfermedades más destructivas en más de 150 especies de plantas de importancia agronómica (Ma *et al.*, 2013).

El daño que causan estos patógenos son factores ampliamente limitantes para la producción de alimentos (Zhao *et al.*, 2014), debido a que pueden infectar a una amplia variedad de hospedantes y causar varios tipos de enfermedad. Después de la germinación y penetración en la raíz, el hongo entra al sistema vascular de la planta y subsecuentemente usa los vasos del xilema como avenidas para colonizar rápidamente a la planta, desencadenando el marchitamiento generalizado, la necrosis y clorosis de las partes aéreas, y causando síntomas de marchitez durante cualquier etapa de desarrollo de las plantas (Roncero *et al.*, 2003; Smit, 2007; Chandra *et al.*, 2011). Por otro lado, son productores de micotoxinas como: ácido fusarico, licomarasmina, funomisinas y tricotecinas, los cuales ocasionan la muerte y degradación de las células, ocasionan el cierre parcialmente de los estomas, reducen la clorofila y detienen la fotosíntesis (Edel-Hermann, 2015). La existencia de un arsenal de factores de virulencia y mecanismos de patogenicidad universales amplían el rango de hospedantes. Sin embargo, los mecanismos no han sido claramente entendidos (Ortoneda *et al.*, 2004). Por otra parte, cuando una planta es atacada por un patógeno, una compleja red de mecanismos de defensa es activada para la protección del daño (Wongpita y Lomthaisong, 2010). Al igual que muchos otros patógenos de plantas, *F. oxysporum* secreta proteínas pequeñas, comúnmente ricas en cisteína, para promover la virulencia mediante la manipulación de su planta hospedante (Rep, 2005; De Wit *et al.*, 2009; Schmidt *et al.*, 2013). Los genes que codifican estas proteínas se encuentran proximales a los elementos transponibles, que juegan un papel clave en la

aparición de nuevos rasgos de virulencia en muchos otros fitopatógenos (Schmidt *et al.*, 2013). El éxito de la infección requiere un número de procesos, tales como la señalización temprana planta-hospedante, ataque a la superficie de la raíz, degradación de barreras físicas, resistencia a compuestos antifúngicos y producción de micotoxinas (Roncero *et al.*, 2003). Por lo tanto, el modelo de *F. oxysporum* puede ser muy útil para proveer nuevas propuestas dentro de la especificidad de la patogénesis fúngica (Ortoneda, *et al.*, 2004), debido a que este patógeno emplea distintas estrategias para el ataque en plantas. Por ello, es necesario realizar estudios direccionados a la presencia de mecanismos comunes de virulencia en plantas (Dean, 2012; Zhang *et al.*, 2005). Por otra parte, la producción en invernadero es cada día un componente muy importante en los sistemas de agricultura, que año con año va en aumento, y en tales cultivos los efectos de marchitez ocasionados por *Fusarium* son serios (Yang *et al.*, 2007). La incidencia (porción de la unidad dañada) y severidad (porción de la superficie de la planta infectada) son las medidas más comunes que se utilizan para referir el daño (Ridout *et al.*, 2007). En el presente trabajo se evaluó el daño que inducen representantes del complejo de especies de *Fusarium* aislados de plantas de garbanzo y chile manzano en diferentes cultivos hortícolas.

4.2 Materiales y métodos

Aislamiento de cepas. Se utilizaron cuatro aislamientos identificados dentro del complejo de especies de *F. oxysporum*, de las cuales dos cepas fueron aisladas de plantas enfermas de chile manzano (*Capsicum pubescens*) con síntomas de marchitez, en los invernaderos de la Universidad Autónoma Chapingo, México y dos cepas (MM25 y GVS48) aisladas de plantas de garbanzo (*Cicer arietinum*) de la región del Bajío, México con síntomas de fusariosis (marchitez y amarillamiento) (Luna *et al.*, 2004). Estas últimas cepas (MM25 y GVS48) son muy agresivas en

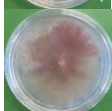
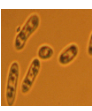
comparación a otros aislamientos de *Fo* (*Fusarium oxysporum*) de acuerdo a trabajos previos (López, 2007). Es por ello que se decidió utilizarlos para la inoculación de los diferentes cultivos incluidos en este estudio; además ambos aislamientos están identificados y disponibles en el GenBank.

Identificación de cepas. Los aislamientos de garbanzo MM25 y GVS48 fueron previamente aislados por Luna *et al.* (2004) e identificados dentro del complejo de especies de *Fusarium* por Medina *et al.* (2014). Las cepas provenientes de plantas de chile manzano (CPC1 y CPC2) con síntomas de marchitez fueron aislados y purificados en medio de cultivo PDA (papa-dextroxa-agar) hasta obtener cepas puras. Se realizó la extracción de DNA mediante el método CTAB (Murray y Thompson, 1980) y se utilizó solamente un primer para RAPDs (Roth C-01) (sus siglas en inglés, *Random Amplified Polymorphic DNA*) para realizar una evaluación y discriminación rápida de ambos genotipos mediante los perfiles de DNA con fines de diferenciarlos. Esto último debido a que las características de desarrollo y color de micelio resultaron ser muy similares. Las condiciones de PCR fueron; un ciclo de 94°C por 4 min, seguido de 38 ciclos [94°C por 30s, 40°C por 30s, 72°C por 1.30 min] y 72°C por 2.5min. Los productos fueron visualizados en geles de agarosa 1.2 % para identificar si las cepas tenían perfiles genéticos diferentes.

Amplificación del gen TEF: Se realizó la amplificación del gen TEF ($\approx$ 800 pb) de los dos aislamientos de chile manzano (CPC1 y CPC2) con los primers: EF-1 (5'ATGGGTAAGGARGACAAGAC3') y EF-2 (5'GGARGTACCAGRSATCTCATG3') (O'Donnell *et al.*, 1998). La mezcla de reacción fue preparada en un volumen de 25 μ L conteniendo 200 μ M de cada dNTP, 1.5 U de *Taq* DNA polimerasa, 1X de amortiguador *Taq*, 1.5 mM de MgCl₂, 20 pmoles de cada primer y 100 ng de DNA. Las condiciones para la PCR fueron: un ciclo de 94 °C por 30s, seguido de 40 ciclos [94 °C por 30s, 62 °C por 30s, 72 °C por 1.5min]

y 72 °C por 2.5min. Los productos obtenidos fueron observados en gel de agarosa 1.2%. Posteriormente, los amplicones, fueron purificados de residuos de primers y dNTPs con la enzima ExoSAP de acuerdo a las condiciones del fabricante (*Applied Biosystems BigDye Terminator v3.1 sequencing Kit*). Los fragmentos fueron secuenciados con el equipo Applied Biosystems 3130/ Genetic Analyzers. Con las secuencias obtenidas, se realizó la búsqueda de similitud por medio del programa BLAST, 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 e identificando el complejo de especies de *Fusarium* al cual pertenecían.

Cuadro 1. Aislamientos empleados para la inoculación

Clave de aislamiento	Origen del aislamiento	Número de accesión TEF del NCBI	Crecimiento de la cepa	Estructuras reproductivas
MM25	Garbanzo	EU091039		
GVS48	Garbanzo	EU091018		
CPC2	Chile manzano	No publicado		
CPC3	Chile manzano	No publicado		

TEF = Factor 1- α de extensión y traducción

NCBI = Centro Nacional de Información en Biotecnología

Siembra de materiales. Se utilizaron semillas de seis cultivos hortícolas (Cuadro 2), las cuales fueron sembradas en charolas de unicel con sustrato *peat moss*: agrolita (2: 1) en diferentes fechas, con la finalidad de obtener plántulas con características adecuadas para el trasplante y realizar la inoculación al mismo momento. Después de la germinación y durante todo el experimento se

regaron las plántulas cada tercer día con la solución nutritiva Steiner 50 %. Se utilizó un diseño completamente al azar con 10 repeticiones en el ciclo primareva-verano (P-V) y otoño-invierno (O-I) 2014.

Cuadro 2. Cultivos utilizados para las evaluaciones con *Fusarium*

Cultivos	Nombre científicos	Variedad	Origen	Días hasta la germinación	Días hasta la 1 ^{ra} hoja verdadera
Calabaza	<i>Cucurbita pepo</i>	Zucchini round Var. Star	Chapingo, Mex.	6	8
Chile manzano	<i>Capsicum pubescens</i>	Jhos	Chapingo, Mex.	10	17
Frijol	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Flor de mayo	Chapingo, Mex.	7	10
Garbanzo	<i>Cicer arietinum</i>	Blanca	Irapuato, Gto	6	11
Jitomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	Silvana	Chapingo, Mex.	9	16
Maíz	<i>Zea mays</i>	Torito amarillo I	Chapingo, Mex.	6	8

Preparación de inoculo. Una vez purificados y activados los aislamientos, se sub-cultivaron en medio de cultivo PDA (Papa-dextrosa-Agar) e incubaron a 24°C durante dos semanas y a 12 h de luz para inducir la formación de macro y microconidios. Posteriormente se realizó el conteo de estructuras reproductivas, agregando agua destilada estéril a las cajas Petri y raspando la superficie del medio con una espátula estéril para desprender los conidios. Se obtuvo así una suspensión y se filtró con una gasa estéril para remover las partículas de restos de agar y micelio. El conteo de conidios se realizó empleando un microscopio y hematocitometro (Marienfeld, Germany) y se realizaron las diluciones correspondientes hasta obtener 1×10^6 conidios/ mL.

Inoculación. La inoculación se realizó cuando las plántulas tenían aproximadamente 4 hojas verdaderas. Para ello, se sacaron cuidadosamente de las charolas de germinación, se lavaron las

raíces para retirar los excesos de sustrato y se cortaron las puntas de las raicillas para que las heridas sirvieran como entrada del hongo. Se sumergieron durante 6 horas las raíces de las plántulas en las suspensiones del inoculo (1×10^6 conidios/ mL). Transcurrido el tiempo, se trasplantaron las plántulas en macetas individuales con sustrato estéril (peat moss-agrolita) en la relación 2:1 para la posterior evaluación del daño.

Análisis de datos. Se tomaron los datos de incidencia (número de plantas enfermas) por unidad experimental a partir del momento en que aparecieron los síntomas. Las plantas que sobrevivieron se extrajeron completas a los 30 días del trasplante y se evaluó la severidad mediante la siguiente escala: 1 = sin lesiones en raíz, corola o tallo (RCT); 2 = menos de cinco lesiones en la raíz y sin obscurecimiento en RTC; 3 = cinco a 10 lesiones radicales y leve obscurecimiento en RTC; 4 = más de 10 lesiones con obscurecimiento en RTC; 5 = pudrición del rizoma o muerte de la planta (Schreuder y Lamprecht, 1995). Los datos obtenidos se sometieron a análisis de varianza no paramétrico basado en rangos y de acuerdo con la metodología descrita por Eskridge (1995). Las medias de los tratamientos se compararon mediante la prueba de Tukey ($p = 0.05$). Adicionalmente, los promedios totales de incidencia o severidad se compararon mediante la prueba de t, con los promedios obtenidos. Para efectuar los análisis se utilizó el paquete SAS 9.0 (2002).

4.3 Resultados y discusión

4.3.1 Identificación de aislamientos de chile manzano

Las huellas de DNA obtenidas con RAPD permitieron diferenciar de forma rápida a las cepas aisladas de plantas de chile manzano que presentaron perfiles diferentes. Por esta razón se consideraron como dos aislamientos distintos.

Las secuencias del gen TEF obtenidas de los aislamientos CPC1 y CPC2 se utilizaron para

identificar la especie o complejo de *Fusarium* a la que pertenecían (Figura 2) o presentaba mayor similitud. Se encontró que las secuencias tenían una identidad del 100% con el número de accesión: JF740724, descrita como complejo de especies de *F. oxysporum* por O'Donnell *et al.* (2012). Por lo tanto, las cepas aisladas de plantas de chile manzano con síntomas de marchitez, pertenecen al complejo de especies de *F. oxysporum*.

4.3.2 Evaluación del daño de *Fusarium* cultivos

Las pruebas de patogenicidad con los cuatro aislamientos del complejo de especies de *Fusarium* utilizadas en los seis cultivos mostraron diferente tipo de daño. Los síntomas observados de manera general fueron: amarillamiento y marchitez vascular, pudrición radical, menor desarrollo de raíces secundarias, manchas rojizas en los haces vasculares de la raíz y muerte de las plántulas. El daño que presentaron los cuatro aislamientos se manifestó a diferentes intensidades y con características particulares para cada cultivo. Esto a pesar de que las cepas fueron aisladas de diferentes plantas hospedantes y con diferente origen geográfico. Lo anterior ya había sido descrito por O'Donnell *et al.* (2008 y 2009) quienes citaron que una sola especie de este complejo puede causar daño en diferentes cultivos.

En la Figura 1 se pueden observar de manera general algunos síntomas que presentaron los cultivos inoculados y que se describen a continuación.

Calabaza: las plántulas presentaron marchitez desde las 6 h de inoculación, seguido de necrosamiento progresivo en la parte basal del tallo a los dos días posterior a la inoculación (dpi), lo cual desencadenó un marchitamiento generalizado, clorosis de las partes aéreas, retraso en el crecimiento en comparación con las plantas testigo y muerte de un 30 % de las plántulas.

Chile manzano: las plántulas presentaron marchitez después de las 6 horas de inoculación;

posteriormente amarillamiento foliar y manchas necróticas en hojas a los 3 dpi. Las plántulas presentaron lento crecimiento y se mantuvo el amarillamiento hasta el final de la evaluación.

Frijol: un alto porcentaje de las plántulas de frijol presentaron oscurecimiento vascular a los 2 dpi, manchas necróticas, epinastia y defoliación, retraso en el crecimiento, marchitez progresiva y muerte del 50 % de las plántulas.

Garbanzo: el primer síntoma fue marchitez, seguido de amarillamiento, marchitez en la parte apical de la hoja de forma progresiva y posterior defoliación de hojas a los 3 dpi, ocasionando retraso en el crecimiento, lento desarrollo de flores y semillas vanas y muerte de un 10 % de las plántulas.

Jitomate: las plántulas presentaron marchitez después de la inoculación, seguido de amarillamiento foliar y epinastia en las hojas a los 2 dpi, coloración purpura en la parte basal del tallo, crecimiento lento, oscurecimiento vascular y muerte del 20 % de plántulas.

Maíz: presentaron marchitez al segundo día de la inoculación; la parte basal del tallo presentó coloración púrpura y necrosis en hojas basales principalmente, pero también en las hojas nuevas y retraso en el crecimiento.

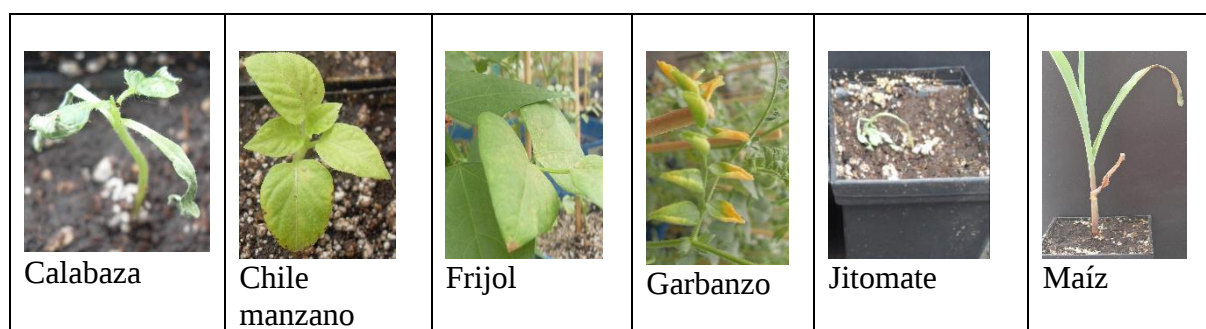


Figura 1. Síntomas inducidos por *Fusarium oxysporum* en diferentes cultivos

El análisis estadístico del daño de los aislamientos de *F. oxysporum* en los diferentes cultivos, permitió identificar que la cepa GVS48 indujo una mayor incidencia en el cultivo de calabaza, seguido de frijol, chile, maíz, jitomate y en último lugar a garbanzo (López, 2007). La severidad

fue mayor en el cultivo de calabaza, seguido de chile, frijol, garbanzo, jitomate y maíz (Cuadro 3). La severidad se evaluó en cada cultivo, en el conjunto de cepas. La incidencia del daño (porcentaje) de daño de acuerdo al ciclo de cultivo fue mayor para O-I de 78.47 % y de 59.13 % para P-V, debido principalmente a las condiciones de de temperatura y humedad que son mayores en O-I.

Cuadro 3. Análisis de Varianza de incidencia y severidad del daño de las cepas del complejo de especies de *Fusarium oxysporum* en diferentes cultivos hortícolas.

Incidencia		Cultivos				
Aislamiento	Calabaza	Chile	Frijol	Garbanzo	Jitomate	Maíz
GSV48	89.23 a	80 a	82.93 a	48.43 a	60.79 a	73.5 a
MM25	77.86 a	59.21 b	64.36 b	38.36 a	61.57 a	65.64 a
CPC1	80 a	40 c	56.36 b	33.43 b	41.5 b	42.36 b
CPC2	44 b	47.79 c	40.71 c	16.64 b	56.07 a	44.79 b
Severidad	72.79 a	61.09 b	56.75 b	56.57 b	54.98 b	34.21 c

Análisis de varianza y pruebas de Tukey ($p < 0.05$). Letras diferentes indican diferencias significativas.

Las pruebas de patogenicidad mostraron que las cuatro cepas de *F. oxysporum* fueron patogénicas en todos los cultivos analizados en este estudio. Reportes en la ocurrencia y patogenicidad de *Fusarium* spp. sólo se basan en muestras de *Fusarium* aislados de plantas de la misma especie (Stankovic *et al.*, 2007; Peters *et al.*, 2008; Dissanayake *et al.*, 2009). Sin embargo, en este estudio, se utilizaron cepas con diferente origen y se inocularon en seis cultivos, mostrando diferente tipo de daño en los cultivos utilizados. Por otro lado, los factores que afectan la patogenicidad son complejos y pueden incluir etapas de crecimiento, variedad de la planta, método de inoculación,

temperatura de cultivo y calidad de inoculación (Zhao *et al.*, 2014). Sin embargo, es importante considerar que para que la infección sea exitosa, se requiere de la coincidencia del inóculo infectivo, tejido del hospedante susceptible y las condiciones favorables en espacio y tiempo. La variabilidad de la asociación es probablemente dada por factores ambientales, sobrevivencia en el suelo, fuentes de inóculo, temperatura, lluvia, humedad relativa, susceptibilidad del hospedante, etc. (Oerke *et al.*, 2010).

Los resultados obtenidos en el presente estudio nos indican que los grupos de patógenos como el complejo de especies de *F. oxysporum* utilizan mecanismos similares para causar la enfermedad en diferentes hospedantes, aun cuando los cultivos pertenecen a diferentes familias. Ya que los aislamientos de un mismo grupo tienen orígenes evolutivos independientes, se sugiere que la capacidad de infectar a una o más especies vegetales puede haber surgido de manera convergente (O'Donnell *et al.*, 1998). Es por lo anterior el interés de examinar la habilidad de estos patógenos para causar daño a diferentes especies y conocer el comportamiento de una cepa patogénica en diferentes cultivos. Nuestros resultados sugieren que estas cepas tienen la capacidad de ocasionar diferentes tipos de daño e inclusive matar a algunas especies, como se observó en plántulas de garbanzo, frijol, calabaza y jitomate. La presencia de la germinación de microconidios en diferentes especies de plantas, sugiere que estas cepas pueden crecer activamente en diferentes tejidos y pueden someterse a ciclos de formación de conidios en distintos hospedantes, como ha sido previamente reportado para *Fusarium* (Ortoneda *et al.*, 2004). La presencia de diferentes tipos de daño, incluso desde las primeras horas de inoculación, indica claramente que las cepas son altamente persistentes con diferentes especies. La persistencia fue particularmente alta en el aislamiento GVS48, el cual presentó mayor incidencia y severidad en todos los cultivos inoculados.

Este trabajo es el primer reporte de cepas de *F. oxysporum* aisladas de diferentes hospedantes y que tienen la capacidad de infectar a diferentes especies de plantas. La disponibilidad de este modelo multisistema representa un paso clave hacia la comprensión de cómo la patogénesis fúngica ha evolucionado en diferentes hospedantes. Los resultados obtenidos con los aislamientos del complejo de especies de *F. oxysporum* sugieren que ciertos factores de virulencia son esenciales en la patogénesis de diferentes especies de plantas. Este hallazgo es importante porque en posteriores estudios se podrá determinar con más precisión el tipo de factores de virulencia propios del complejo de *F. oxysporum*. Además, éste sistema planta: complejo *Fusarium oxysporum*, podría ser un modelo útil para la identificación de grados de virulencia en variantes de este complejo de hongos. Un estudio similar a éste fue realizado por Ortoneda *et al.* (2004) quienes utilizaron las cepas 4287 y PA14 en jitomate y ratones, y en ambos sistemas biológicos, dichos hongos causaron daño.

Los fitopatógenos como *Fusarium* tienen la capacidad de presentar variaciones que pueden tener un impacto directo en su actividad biológica y su rol en el ambiente (Emokhonov *et al.* 1993). Entre los patógenos fúngicos que afectan a plantas, las variaciones pueden ocurrir en alguna etapa de crecimiento para cambiar su morfología o virulencia que determine su rango de hospedantes, potencial de inoculación e infectividad (Van der Does *et al.*, 2008). Una característica de *Fusarium* es la producción de toxinas, compuestos que se han encontrado comunes en varias especies, así como familias de compuesto que son específicos para ciertas especies (Emokhonov *et al.*, 1993).

4.4 Conclusión

Los aislamientos (GSV48, MM25, CPC1 y CPC2) identificados dentro del complejo de especies de *F. oxysporum* de acuerdo al gen TEF, presentaron diferentes tipos de daño al inocularlos en los

cultivos de calabaza, chile manzano, frijol, jitomate, garbanzo y maíz, mostrando que el aislamiento GSV48 fue el más agresivo. Por lo anterior, es posible plantear que un sólo aislamiento es capaz de causar daño en diferentes cultivos, aun cuando los aislamientos presentan diferentes orígenes geográficos y fueron obtenidos de diferentes hospedantes. Por lo tanto, es posible considerar a *F. oxysporum* como un modelo para estudiar los mecanismos generales de virulencia.

4.5 Literatura citada

- Chandra S., N., E. G. Wulff., A. C. Udayashankar., B. P. Nandini., S. R. Niranjana., C. N. Mortensen., H. S. Prakash. 2011. Prospects of molecular markers in *Fusarium* species diversity. *Applied Microbiology and Biotechnology* 90: 1625–1639
- De Wit, P., J., R. Mehrabi., A. Van den Burg H., I. Stergiopoulos. 2009. Fungal effector proteins: past, present and future. *Molecular Plant Pathology Journal* 10: 735–747.
- Dean R., J. Van K., A., L., Z. A. Pretorius., Kim E., H. Kosack, A. Di Pietro., P. D. Spanu, J. J. Rudd., M. Dickman., R. Kahmann., J. Ellis., G. D. Foster. 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 13: 414–430.
- Dissanayake M., L., M., C., R. Kashima., S. Tanaka., S. Ito. 2009. Genetic diversity and pathogenicity of *Fusarium oxysporum* isolated from wilted Welsh onion in Japan. *Journal of General Plant Pathology* 75: 125–130.
- Edel H., G. Nadine., M. Arnaud., S. Christian. 2015. *Fusarium* diversity in soil using specific molecular approach and cultural approach. *Journal of Microbiological Methods* 111:64–71
- Emokhonov V., N., N. Groznov I., A. Monastirskii O., Y. Permogorov A. 1993. Detection of grain infection with specific toxicogenous fungal species gas chromatography–mass spectrometric analysis of volatile metabolites. In: *Mass spectrometry for the*

- characterization of microorganisms, ACS Symposium Series, pp 85–90.
- Luna P. A., Silva R. H. V., Marbán M. N. y Valadez M. E. 2004. Variabilidad genética de *Fusarium oxysporum* Schlechtend.:FR. F. sp. *ciceris* (Padwick) Matuo y K. Sato mediante PCR-RAPD'S en el Bajío México. Revista Mexicana de Fitopatología 22: 44-51.
- Ma L., J., D. M. Geiser., H. Robert., P. Alejandro P., R., K. O'Donnell., F. Trail., D., M. Gardiner, J. M. Manners., Kemal K. 2013. *Fusarium* Pathogenomics. Annual Review of Microbiology Journal 67: 399–416
- Medina M., C., G. M. Beltran R., A. López L., L. X. Zelaya M., E. Valadez M. 2014. Characterization and Identification of *Fusarium* Species Complexes Affecting Chickpea with Total Protein Profiles, TEF Gen. Annual Research & Review in Biology 4:3513-3523.
- Murray M., G., F. Thompson W. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research 8: 4321-4325.
- Murray M., G., W. F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight DNA. Nucleic Acids Res. 8:4321-4325.
- O'Donnell K., A. Sutton D., A. Fothergill., D. McCarthy., G. Rinaldi M., E. Brandt M., N. Zhang., M. Geiser D. 2008. Molecular phylogenetic diversity, multilocus haplotype nomenclature, and in vitro antifungal resistance within the *Fusarium solani* species complex. Journal of Clinical Microbiology 46: 2477–2490.
- O'Donnell K., C. Gueidan., S. Sink., P. R. Johnston., P. W. Crous., A. Glenn., R. Riley., N. C. Zitomer., P. Colyer., C. Waalwijk., T. Van der Lee., A. Moretti., S. Kang. 2009. A two-locus DNA sequence database for typing plant and human pathogens within the *Fusarium oxysporum* species complex. Fungal Genetics and Biology 46: 936–948
- O'Donnell K., H. C. Kistler, E. Cigelnik, and R. C. Ploetz. 1998. Multiple evolutionary origins of

- the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95:2044–2049.
- O'Donnell K., A. Humber R., M. Geiser D., S. Kang., B. Park., A. Robert V., W. Crous P., R. Johnston P., T. Aoki., P. Rooney A., A. Rehner S. 2012. Phylogenetic diversity of insecticolous fusaria inferred from multilocus DNA sequence data and their molecular identification via FUSARIUM-ID and *Fusarium* MLST. *Journal Mycologia* 104: 427-445.
- Oerke E., C., A. Meiera, H. W. Dehnea., *et al.* 2010. Spatial variability of fusarium head blight pathogens and associated mycotoxins in wheat crops. *Plant Pathology* 59: 671–682
- Ortoneda M., J., G., M. P. Madrid., Z. Caracuel., M. I. G. Roncero., E. Mayayo., A. Di Pietro. 2004. *Infection and Immunity* 72: 1760–1766.
- Peters R. D., Macleod C., A. Seifert K., A. Martin R., R. Hale L., R. Grau C., S. MacInnis S. 2008. Pathogenicity to potato tubers of *Fusarium* spp. isolated from potato, cereal and forage crops. *American Journal of Potato Research* 85: 367–374.
- Rep M. 2005. Small proteins of plant-pathogenic fungi secreted during host colonization. *FEMS Microbiology Letters* 253, 19–27.
- Ridout M., S., Y. K. Wan Y., Xu X. 2007. Sampling schemes for estimating spikelet incidence of *Fusarium* head blight. *Annals of Applied Biology* 151: 341–7.
- Roncero M. I. G., C. Hera., M. Ruiz R., F. I. García M., M. P. Madrid., Z. Caracuel., F. Calero., J. Delgado J., R. Roldán R., C. Velasco., J. Roa., M. Martín U., D. Córdoba., A. Di Pietro. 2003. *Fusarium* as a model for studying virulence in soilborne plant pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 62: 7–98.
- Schmidt S., M., Houterman P., M., Schreiver I., M. L. Amyotte., S. Chellappan., B. Boeren., S.

- Takken F., L., M. Rep. 2013. MITEs in the promoters of effector genes allow prediction of novel virulence genes in *Fusarium oxysporum*. BMC Genomics 14: 119.
- Schreuder W., Lamprecht S., C. 1995. Pathogenicity of three *Fusarium* species with asparagus in South Africa. Plant Disease 79: 177-181.
- Smith S., N. 2007. An overview of ecological and habitat aspects in the genus *Fusarium* with special emphasis on the soil-borne pathogenic forms. Plant Pathology Bull 16: 97–120.
- Stankovic S., Levic J., Petrovic T., Logrieco A., Moretti A. 2007. Pathogenicity and mycotoxin production by *Fusarium proliferatum* isolated from onion and garlic in Serbia. European Journal Plant Pathology 118: 165–172.
- Van der Does H., B. Lievens., Claes L., M. Housterman., J. Cornelissen B., M. Rep. 2008. The presence of a virulence locus discriminates *Fusarium oxysporum* isolates causing tomato wilt from other isolates. Environmental Microbiology 10: 1475– 1485.
- Wongpia A., Khemika L. 2010. Changes in the 2DE protein profiles of chilli pepper (*Capsicum annuum*) leaves in response to *Fusarium oxysporum* infection. Science Asia 36: 259–270.
- Yang X., H., Z. Lu G., H. Zhao Z., L. Liu L., M. Yao X. 2007. Isolation and identification of fusarium species from cucumber wilt diseased plants in vegetable greenhouses in Northeastern China. Journal of Shenyang Agricultural University 38: 308–311.
- Zhang Z. et al. 2005. Molecular detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* and *Mycosphaerella melonis* in infected plant tissues and soil. FEMS Microbiology Letters 249: 39–47
- Zhao B., Y. Jianfang., Z. Shuo., L. Xian., G. 2014. Phylogeny and pathogenicity of *Fusarium* spp. isolated from greenhouse melon soil in Liaoning Province. Saudi Journal of Biological Sciences 21: 374-379.

Capítulo V. Evaluación de la susceptibilidad y tolerancia de *Capsicum* sp. con representantes del complejo de *Fusarium oxysporum*

Resumen

Capsicum es un cultivo importante a nivel mundial. La producción ha incrementado aproximadamente 200 % desde el año 2000. En México se cultivan 4 de las 5 especies domesticadas de *Capsicum* (*C. annuum*, *C. frutescens*, *C. chinense* y *C. pubescens*). Sin embargo, el daño por marchitez causado por *Fusarium oxysporum* en este cultivo amenaza seriamente la producción. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el daño que causan representantes del complejo de especies de *F. oxysporum* en diferentes cultivares de Chile (*Capsicum annuum* y *Capsicum frutescens*) para identificar la susceptibilidad y tolerancia. Se utilizaron cuatro aislamientos de FOSC: dos aislados de plantas de garbanzo y dos de Chile manzano y se inocularon en diferentes cultivares de Chile. Los aislamientos representantes del complejo de especies de *F. oxysporum* tuvieron la capacidad de causar daño en *C. annuum* y *C. pubescens*. La intensidad del daño fue diferente en los cultivares identificando a “Piquín” como susceptible y al cultivar criollo Morelos CM334 como resistente a los aislamientos utilizados. *F. oxysporum* puede utilizarse como un modelo útil para estudiar los mecanismos de virulencia e identificar las variantes en plantas susceptibles y resistentes.

Palabras clave: incidencia, severidad, pruebas de patogenicidad, marchitez, interacción planta-patógeno.

5.1 Introducción

El chile (*Capsicum* sp.) es ampliamente cultivado y usado alrededor del mundo. En México se cultivan 4 de las 5 especies domesticadas de *Capsicum* (*C. annuum*, *C. frutescens*, *C. chinense* y *C. pubescens*); y se ha considerado el centro de origen, domesticación y diversidad de *C. annuum* y *C. frutescens* (Eshbaugh, 1993). Este calificativo se debe a que México es el país que presenta la mayor variabilidad de formas cultivadas y silvestres de las cuatro especies de *Capsicum* antes mencionadas, los cuales se encuentran ampliamente distribuidos y la producción ha incrementado en un 200 % desde el 2000 (FAOSTAT, 2008). Sin embargo, el daño de marchitez causado por *F. oxysporum* en este cultivo, comprende una serie de efectos que reducen el crecimiento, desarrollo del fruto y calidad, amenazando la producción (Roncero *et al.*, 2003). Este hongo entra al sistema vascular vía los tejidos de la raíz y subsecuentemente se mueve a través de vasos del xilema con una rápida colonización de la planta, mostrando los síntomas característicos de marchitez (Dubey *et al.*, 2007). El control de *F. oxysporum* ha sido difícil, debido a que este sobrevive en el suelo por muchos años y los fungicidas comerciales usados para controlar la enfermedad son perjudiciales para el ambiente (Dekker, 1976).

Las interacciones entre plantas y patógenos han sido estudiadas en diferentes cultivos y clasificadas en incompatibles y compatibles. En una interacción incompatible una planta es resistente ya que emplea mecanismos de defensa contra el ataque del patógeno y evita el desarrollo del daño, en el caso de una interacción compatible también emplea sus mecanismos de defensa pero sin éxito, por que no son los adecuados ni en el tiempo requerido (Batista *et al.*, 2011). La generación de señales locales, activación de la respuesta hipersensible, acumulación de pared celular, síntesis de fitoalexinas, expresión de proteínas relacionadas a patogénesis e inducción de resistencia sistémica son activadas como mecanismos de defensa (Dickinson, 2003). La primera

línea de defensa activa es constituida por la pared celular que sufre varios cambios estructurales y químicos. Las alteraciones que sufre la pared celular comprenden la deposición de calosa, ligninas, compuestos antimicrobianos, entrecruzamiento de proteínas de la pared celular y la explosión oxidativa (Wang *et al.*, 2005; Develey y Galiana, 2007). La acumulación de materiales adicionales en las paredes celulares alrededor del área de infección previene la expansión del patógeno y simultáneamente protege a los tejidos de las plantas (Schmelzer, 2002; Van Baarlen *et al.*, 2007). Por otro lado, en una interacción compatible una planta susceptible es infectada por un patógeno adaptado, incluyendo el desarrollo del daño, lo que comúnmente conduce a la muerte. Estudios demuestran que en algunas plantas la reacción de defensa puede ser retrasada o el patógeno puede emplear mecanismos para inhibir la defensa (Desender *et al.*, 2007; Rinaldi *et al.*, 2007). La comprensión de las interacciones planta-patógeno incluye respuestas de defensa que pueden conducir al desarrollo de nuevas estrategias para el control de enfermedades de las plantas (Van Baarlen *et al.*, 2007). Es por lo anterior que en el presente trabajo se evaluó el daño que causan representantes del complejo de especies de *F. oxysporum* en diferentes cultivares de chile (*Capsicum annuum* y *Capsicum frutescens*) para identificar la susceptibilidad y tolerancia.

5.2 Materiales y métodos

Aislamiento de cepas. Se utilizaron cuatro aislamientos identificados dentro del complejo de especies de *F. oxysporum*, de las cuales dos cepas fueron aisladas de plantas enfermas de chile manzano (*C. pubescens*) (CPC1 y CPC2) con síntomas de marchitez en los invernaderos de la Universidad Autónoma Chapingo, México y dos cepas (MM25 y GVS48) aisladas de plantas de garbanzo de la región del Bajío, México con síntomas de fusariosis (marchitez y amarillamiento) (Luna *et al.*, 2004).

Siembra de materiales. Se utilizaron siete cultivares de chile (Cuadro 1), los cuales fueron sembrados en charolas de unicel con sustrato *peat moss*: agrolita (2:1) en diferentes fechas con la finalidad de obtener plántulas con cuatro hojas verdaderas e inocular al mismo tiempo. Después de la germinación y durante todo el experimento se regaron las plántulas cada tercer día con la solución nutritiva Steines 50 %. Se utilizó un diseño completamente al azar con 10 repeticiones en el ciclo primareva-verano (P-V) y otoño-invierno (O-I) 2014.

Cuadro 1. Cultivares de *Capsicum* spp. utilizados para las evaluaciones con *Fusarium*

Chiles	Nombre científicos	Variedad	Origen	Días a germinación	1 ^{ra} hoja verdadera
Manzano	<i>C. pubescens</i>	Jhos 3x4	Chapingo, Mex.	10	25
Jalapeño	<i>C. annuum</i>	H952	Comercial	8	20
Serrano	<i>C. annuum</i>	Aqtex	Comercial	8	20
Piquín	<i>C. annuum</i>	Puebla	Puebla	15	30
Tipo serrano	<i>C. annuum</i>	CM334	Colegio de Posgraduados, Montecillo, Méx.	12	23
Huacle	<i>C. annuum</i>		Colegio de Posgraduados, Montecillo, Méx.	10	22
Pimiento	<i>C. annuum</i>	Yolo Wonder	Comercial	9	19

Preparación de inóculo. Una vez purificados y activados los aislamientos, se sub-cultivaron en medio de cultivo PDA (Papa-Dextrosa-Agar) e incubaron a 24 °C durante dos semanas y a 12 h

de luz para inducir la formación de macro y microconidios. Posteriormente, se realizó el conteo de estructuras reproductivas, agregando agua destilada estéril a las cajas Petri y raspando la superficie del medio con una espátula estéril para desprender los conidios, se obtuvo así una suspensión y se filtró con una gasa estéril para remover las partículas de restos de agar y micelio. El conteo de conidios se realizó empleando un microscopio y hematocitometro (Marienfeld, Germany) y se realizaron las diluciones correspondientes hasta obtener 1×10^6 conidios/ mL.

Inoculación. La inoculación se realizó cuando las plántulas tenían aproximadamente 4 hojas verdaderas. Para ello, se sacaron cuidadosamente de las charolas de germinación, se lavaron las raíces para retirar los excesos de sustrato y se cortaron las puntas de las raicillas para que las heridas sirvieran como entrada del hongo. Posteriormente las raíces, se sumergieron durante 6 horas en las suspensiones del inóculo (1×10^6 conidios/ mL). Transcurrido el tiempo se trasplantaron las plántulas en macetas individuales con sustrato estéril (*Peat most-agrolita*) en la relación 2:1 para la posterior evaluación del daño.

Análisis de datos. Se tomaron los datos de incidencia (número de plantas enfermas) por unidad experimental a partir del momento en que aparecieron los síntomas. Las plantas que sobrevivieron se extrajeron completas a los 30 días del trasplante y se evaluó la severidad mediante la siguiente escala: 1 = sin lesiones en raíz, corola o tallo (RCT); 2 = menos de cinco lesiones en la raíz y sin obscurecimiento en RTC; 3 = cinco a 10 lesiones radicales y leve obscurecimiento en RTC; 4 = más de 10 lesiones con obscurecimiento en RTC; 5 = pudrición del rizoma o muerte de la planta (Schreuder y Lamprecht, 1995). Los datos obtenidos se sometieron a análisis de varianza no paramétrico basado en rangos y de acuerdo con la metodología descrita por Eskridge (1995). Las medias de los tratamientos se compararon mediante la prueba de Tukey ($p = 0.05$). Adicionalmente, los promedios totales de incidencia o severidad se compararon mediante la prueba

de t, con los promedios obtenidos. Para efectuar los análisis se utilizó el paquete SAS 9.0 (2002).

5.3 Resultados y discusión

Los resultados obtenidos en las pruebas de patogenicidad de las cepas de *Fusarium* en los diferentes cultivares de *Capsicum* spp. permitió identificar el daño en diferentes intensidades de acuerdo a cada especie. De manera general la enfermedad se caracterizó por la aparición de los síntomas de marchitamiento, acompañada del amarillamiento parcial de las hojas, lo cual ocasionó una disminución en el crecimiento, con respecto a las plantas testigo. En estados iniciales (15 dpi), las hojas se presentaron cloróticas, además de una coloración café-rojizo en los tallos.



Figura 1. Daño por *Fusarium oxysporum* en plántulas de *Capsicum* spp.: (a) “Piquín” a los 25, 15 y 5 dpi de izquierda a derecha con la cepa MM25, (b) “Piquín” a los 5, 15 y 25 dpi de izquierda a derecha con la cepa GSV48, (c) y (d) testigo, Piquín sin inocular.

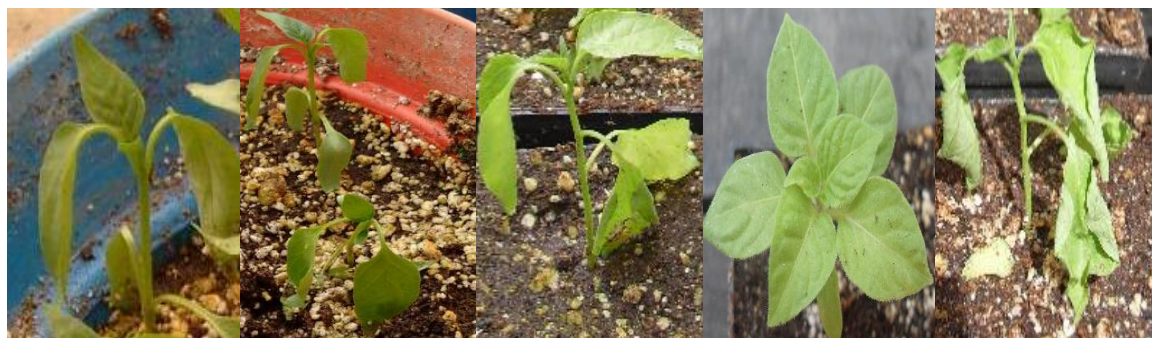


Figura 2. Síntomas de marchitez y amarillamiento en plántulas en los cultivares: huacle, Yolo Wonder, jalapeño, manzano y serrano (de izquierda a derecha) a los 5 dpi.

En la Figura 1 se pueden observar algunos de los síntomas típicos como: amarillamiento, tallos café-rojizo y disminución en el crecimiento de raíz y hojas en plántulas de chile Piquín, así como la comparativa con CM334 sin presencia de daño al identificarse como resistente. En la Figura 2 se presenta el síntoma de marchitez en el resto de los cultivares de chile.

Cuadro 2. Incidencia y severidad del daño de las cepas del complejo de especies de *Fusarium oxysporum* en chile (*Capsicum* spp.) a los 30 dpi.

Incidencia		Cultivares					
Aislamiento	Manzano	Jalapeño	Serrano	Piquín	CM334	Huacle	Yolo wonder
GSV48	68.36 a	62 a	59.63 a	98.33 a	12.89 a	69.53 a	55 a
MM25	65.86 a	62.23 b	59.38 b	95.32 a	13.47 a	65.84 a	59.24 a
CPC1	50 a	42 c	52.46 b	73.23 b	10.52 a	38.34 b	52 a
CPC2	35 b	49.59 c	38.73 c	76.65 b	15.27 a	40.65 b	52.87 a
Severidad	78.69 a	60.19 b	61.45 b	88.33 b	12.02 b	40.22 c	65.10 b

Análisis de varianza y pruebas de Tukey ($p < 0.05$). Letras diferentes presentan diferencias estadísticamente significativas.

El porcentaje de daño producido por representantes del complejo de *F. oxysporum* presentó diferencias entre los 7 cultivares evaluados (Cuadro 2). Los aislamientos GSV48 y MM25, presentaron los valores más altos de incidencia de manera general en todos los cultivos (Figura 1). Los valores de incidencia y severidad presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$), destacando a Piquín como susceptible con valores de 73 al 98 % de daño y a CM334 como resistente con valores de 10 a 15 %. La severidad fue mayor en Piquín con 88 % y menor en CM334 con valor de 12 % (Cuadro 1). El resto de los cultivares presentaron valores intermedios con respecto a los de Piquín y CM334 antes mencionados (Cuadro 1 y Figura 2). El porcentaje de daño de acuerdo

al ciclo de cultivo fue mayor para O-I de 82.43 % y de 49.13 % para P-V. El síntoma característico que presentaron las plantas susceptibles fueron: hojas cloróticas, enanismo, marchitez y muerte de la planta, como ha sido descrito por Garcés *et al.* (2001), mientras que en las plantas resistentes la clorosis fue más leve o sin síntoma. Gocmen y Aback (2006) reportaron 6 accesiones de *C. annuum* resistentes a *Fusarium* de 25 accesiones evaluadas con resistencia a *Phytophthora capsici* y algunos autores han reportado moderada resistencia a *Fusarium* (Kelaiya *et al.*, 2000). El cultivar criollo Morelos 334 ha sido identificado con altos niveles de resistencia a diferentes patógenos, incluyendo *P. capsici*, virus moteado del chile y a las principales especies del nematodo del género *Meloidogyne*, por lo que este cultivar ha sido extensamente usado para investigaciones (Kim *et al.*, 2014).

Cuando una planta es atacada por patógenos, una compleja red de mecanismos de defensa es activada para protección del daño. En las interacciones planta-microorganismos compatible (es decir, susceptible) e incompatible (es decir, resistente) las plantas responden secretando sus propios grupos de proteínas. Estas proteínas relacionadas a patogénesis pueden causar daño directo invadiendo o jugando un rol de protección, en la inhibición de enzimas de degradación de pared celular secretadas por patógenos (Van Loon y Van Strien, 1999). Estudios han mostrado cambios en los niveles de expresión de las enzimas malato deshidrogenasa y superóxido dismutasa durante las interacciones compatible e incompatible (Mukherjee *et al.*, 2009; Mandal *et al.*, 2011).

Las plantas tiene la capacidad de protegerse ante el ataque de infecciones fungosas y a otros factores bióticos y abióticos por medio de diferentes vías. Las plantas se defienden mediante el fortalecimiento físico de la pared celular a través de la lignificación, suberización y producción de varias proteínas relacionadas a patogénesis (PR) incluyendo las enzimas hidrolíticas quitinasa y β -1, 3-glucanasa que son muy importantes durante el ataque de patógenos (Ebrahim *et al.*, 2011).

5.4 Conclusiones

Los aislamientos representantes del complejo de especies de *F. oxysporum* tuvieron la capacidad de ocasionar daño en *C. annuum* y *C. pubescens*. Las cepas GSV48 y MM25 resultaron ser las que ocasionaron mayor daño en todos los cultivares de *Capsicum*. La intensidad del daño fue diferente en los cultivares empleados por lo que fue posible identificar a “Piquín” como susceptible y a CM334 como resistente a las cepas utilizadas de *F. oxysporum*. El resto de los materiales presentaron valores intermedios de incidencia y severidad. Por lo anterior, *F. oxysporum* puede utilizarse como un modelo útil para estudiar los mecanismos de virulencia e identificar las variantes en plantas susceptibles y resistentes.

5.5 Literatura citada

- Batista S., C., R., A. Borges S., B., R. Cabral S., C. N. Monteiro C., S. Henri D., M. Luícia H. 2011. Identification of sequences expressed during compatible black pepper—*Fusarium solani* f. sp. *piperis* interaction. *Acta Physiology Plant* 33: 2553–2560.
- Dekker J. 1976. Acquired resistance to fungicides. *Annual Review Phytopathology* 14: 405–28.
- Desender S., D. Andrivon., F. Val. 2007. Activation of defence reactions in Solanaceae: where is the specificity? *Cell Microbiology* 9: 21–30.
- Develey R., M., E. Galiana. 2007. Resistance to pathogens and host developmental stage: a multifaceted relationship within the plant kingdom. *New Phytology* 175: 405–416.
- Dickinson M. 2003. *Molecular Plant Pathology*. Scientific Publishers London pp. 145–195.
- Dubey S., C., M. Suresh B., Singh. 2007. Evaluation of *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* for integrated management of chickpea wilt. *Biological Control* 40: 118–27.

- Ebrahim S., K. Usha., Singh B. 2011. Pathogenesis Related (PR) Proteins in Plant Defense Mechanism. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. A. Méndez-Vilas (Ed.). pp. 1043-1054.
- Eshbaugh W., H. 1993. Peppers: History and exploitation of a serendipitous new crop discovery. In: Janick J, Simon JE, editors. New crops. New York, USA: Wiley pp. 132–139.
- Eskridge K. 1995. Statistical analysis of disease reaction data using nonparametric methods. HortScience 30: 478-480.
- FAOSTAT. 2008. Agricultural production. <http://www.faostat.fao.org/>
- Garcés G., E., A. Orozco M., B. Rocío G., H. Valencia. 2001. *Fusarium oxysporum* el hongo que nos falta conocer. Acta Biológica Colombiana 6: 1-725.
- Göçmen M., K. Abak. 2006. Determine the genotypes resistant to *Fusarium solani* in pepper (*Capsicum annuum* L.). Bahçe 35: 1-8.
- Kelaiya D., S., M. Parakhia, A. 2000. Screening of chilli varieties against Fusarium wilt. Gujarat Agricultural University Research Journal 25: 101-102.
- Kim S., M. Park., S. Yeom., Y. Kim., J. Min L. 2014. Genome sequence of the hot pepper provides insights into the evolution of pungency in *Capsicum* species. Nature Genetics 46: 3.
- Luna P., A., H. V. Silva R., N. Marbán M., E. Valadez M. 2004. Variabilidad genética de *Fusarium oxysporum* Schlechtend.:FR. F. sp. *ciceris* (Padwick) Matuo y K. Sato mediante PCR-RAPD'S en el Bajío México. Revista Mexicana de Fitopatología 22: 44-51.
- Mandal S., K. Das R., S. Mishra. 2011. Differential occurrence of oxidative burst and antioxidative mechanism in compatible and incompatible interactions of *Solanum lycopersicum* and *Ralstonia solanacearum*. Plant Physiology and Biochemistry 49: 117–123.

- Mukherjee A., K., S. Lev S. Gepstein A. Horwitz B. 2009. A compatible interaction of *Alternaria brassicicola* with *Arabidopsis thaliana* ecotype DiG: evidence for a specific transcriptional signature. *BMC Plant Biology* 9: 31.
- Rinaldi C., A. Kohler., P. Frey., F. Duchaussoy., N. Ningre., A. Couloux., P. Wincker., D. Le Thiec., S. Fluch., F. Martin., S. Duplessis. 2007. Transcript profiling of poplar leaves upon infection with compatible and incompatible strains of the foliar rust *Melampsora larici-populina*. *Plant Physiology* 144: 347–366.
- Roncero M., I., G., C. Hera., R. Ruiz M., G. Maceira F. I., M. Madrid P., Z. Caracuel., F. Calero., J. Delgado J., *et al.* 2003. *Fusarium* as a model for studying virulence in soilborne plant pathogens. *Physiology Molecular Plant Pathology* 62: 87–98.
- Schmelzer E. 2002. Cell polarization, a crucial process in fungal defence. *Trends Plant Science* 7:411-415.
- Schreuder W., Lamprecht S., C. 1995. Pathogenicity of three *Fusarium* species with asparagus in South Africa. *Plant Disease* 79: 177-181.
- Van B., P., J. Woltering E., M. Staats., J. Van Kan A., L. 2007. Histochemical and genetic analysis of host and non-host interactions of *Arabidopsis* with three *Botrytis* species: an important role for cell death control. *Molecular Plant Pathology* 8: 41-54
- Van L., L., C. and E. Van S., A. 1999. The families of pathogenesis related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiology Molecular Plant Pathology* 55: 85–97.
- Wang D., N. Weaver D., M. Kesarwani. 2005. Induction of protein secretory pathway is required for systemic acquired resistance. *Science* 308: 1036–1040.

Capítulo VI. Discusión general

Fusarium oxysporum es un complejo de especies que engloba aislamientos genética y fenotípicamente diversos, que han sido encontrados en un amplio rango de ecosistemas. Muchos estudios del complejo de especies de *F. oxysporum* (FOSC) han sido enfocados en aislamientos patogénicos de plantas, debido a que causan daño en más de 150 cultivos de importancia agrícola y hortícola (Michielse y Rep, 2009). Algunos miembros de FOSC también infectan animales, como los humanos y a insectos (O'Donnell *et al.*, 2012; Ortoneda *et al.*, 2004). Los aislamientos patogénicos de plantas han sido clasificados en base al rango de hospedantes en formas especiales (Dignani and Anaissie, 2004; O'Donnell *et al.*, 2004).

6.1 Fusariosis en garbanzo en la región del Bajío, México

F. oxysporum f. sp. *ciceris* (*Foc*) ha sido caracterizado como causante de la fusariosis (amarillamiento y marchitez) en el cultivo de garbanzo (Jiménez *et al.*, 2004). En el presente estudio se identificó a la raza 5 de *Foc* en dos aislamientos de la región del Bajío; sin embargo, no se tiene claro, debido a que se encontrar diferencias en los análisis filogenéticos de los genes utilizados para filogenia (TEF, IGS, ITS, mtSSU y NIR), estas diferencias se pueden deber a las características propias de los genes, debido a que estas regiones tienden a evolucionar a una velocidad mayor (O'Donnell *et al.* 1998; O'Donnell, 2000). TEF es considerado como el gen esencial en análisis multigénicos, ya que cerca del 6 % de los nucleótidos que lo conforman son considerados cladísticamente significativos. Además, el 95 % de estos nucleótidos se encuentran en regiones exónicas, en donde se han detectado procesos de transición de bases, lo que genera un 50 % más de información que otros genes usados en *Fusarium*, otorgándole un mayor nivel de

confianza y utilidad (Geiser *et al.*, 2004). El gen de TEF sugiere que ha estado bajo pocas restricciones evolutivas, como se deduce de los patrones de mutación que incluyen delecciones de bases (O'Donnell *et al.*, 1998; Kristensen *et al.*, 2005). Es posible que algunos de los aislamientos de *Foc* obtenidos en este estudio provengan de linajes diferentes, lo que explicaría las diferencias en los análisis filogenéticos, haciendo difícil su interpretación.

Los resultados de este estudio revelan similitudes y diferencias en el genoma nuclear de los aislamientos de garbanzo de la región del Bajío y las razas de *Foc*, lo cual está vinculado a nivel de genes y a la conservación de los mismos, así como a porciones de inserciones similares que parecen estar relacionadas. A pesar de eso, la variación en las secuencias puede deberse principalmente a la incorporación de bases en intrones y regiones intergenicas. Las diferencias identificadas en los arboles filogenéticos de varios genes sugieren a la selección parcial y/ o recombinación en el genoma nuclear, potencialmente ligados a eventos de hibridación (Gerda *et al.*, 2013). Las mutaciones, así como la transferencia horizontal, pueden generar variación individual en una especie, y esta variación es distribuida y/ o acumulada a través de la recombinación sexual o parasexual, esto ha sido generalmente asumido en este ascomicete asexual *F. oxysporum* (Hirano y Arie, 2009). Las formas especiales que causan daño en el cultivo de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, exhiben una amplia variación patogénica aun cuando se ha considerado que son de origen monofilético (Jiménez y Jiménez, 2002). Otras formas especiales han sido reportadas como monofiléticas y la relación genética estrecha entre las razas de *Foc* ha llevado a la hipótesis de que éstas se obtuvieron en un proceso gradual, en lugar de una evolución de forma independiente (Gordon y Martyn, 1997). A pesar de que esta es una hipótesis razonable, la falta de resolución filogenética con formas especiales monofiléticas hacen difícil analizar las vías de evolución de la variación del patógeno.

6.2 Filogenia en *F. oxysporum*

Un análisis filogenético bien definido es fundamental para el estudio de la evolución, biología poblacional y modelo reproductivo de los miembros de FOSC. Respuestas claras a las preguntas tales como si las cepas de FOSC pueden reproducirse sexualmente y si la especificidad del hospedante ha evolucionado vertical u horizontalmente ayudan a entender y desarrollar estrategias de manejo y a la regulación cuarentenaria (Geiser *et al.*, 2013). Marcadores moleculares como la región IGS y genes que codifican a los genes TEF, poligalacturonasas, mtSSU, fosfato permeasa, β -tubulina, nitrato reductasa y de apareamiento han sido evaluados para resolver la filogenia de FOSC. Sin embargo, solamente TEF e IGS proveen suficiente información filogenética y han proporcionado información suficiente para determinar el alto grado de variación y diversidad genética en FOSC (O'Donnell *et al.*, 2009). Adicionalmente, el potencial para producir micotoxinas como moniliformina, fumonisina y eniatina han sido empleados para complementar los análisis filogenéticos. Sin embargo, las relaciones filogenéticas (sobre la base de estos metabolitos) no han sido determinados, lo que subraya en la necesidad de identificar un nuevo conjunto de marcadores para una inferencia filogenética más robusta (O'Donnell *et al.* 2009).

Es importante conocer con precisión la identidad de *Fusarium* y su diversidad genética para el adecuado control de la enfermedad. El análisis de secuencias nos permitió identificar que los aislamientos asociados a la marchitez vascular del garbanzo en la región del Bajío, México de plantas con síntomas de amarillamiento y marchitez, están asociados a complejos de especies de *Fusarium*. Los resultados mostraron que el gen TEF permitió resolver relaciones filogenéticas entre aislamientos de *Fusarium* de plantas de garbanzo con síntomas de fusariosis de la región del Bajío que mostraban los patotipos de amarillamiento y marchitez, característicos de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*. La información del gen TEF provee información suficiente para diferenciar entre

aislamientos. Resultados filogenéticos con el gen TEF confirmaron la presencia de cuatro complejos de especies de *Fusarium* en la región del Bajío. En este trabajo fue posible establecer una correlación entre los tres filogramas con TEF, ITS y mtSSU permitiendo identificar a los aislamientos analizados y ubicarlos en los complejos de especies de *F. oxysporum*, *G. fujikuroi*, *F. incarnatum-equiseti* y *F. solani*. Los resultados obtenidos permiten decir que las especies de *Fusarium* que son altamente diversas y filogenéticamente distintas (Kristensen *et al.*, 2005), y que son capaces de producir síntomas parecidos entre las plantas hospedantes de este tipo de hongos. Lo anterior sugiere que la patogenicidad ha evolucionado de manera convergente y que cada linaje clonal tiene propiedades patógenicas únicas (O'Donnell *et al.*, 1998), lo cual ha hecho difícil el manejo de información sobre la diversidad genética de *Fusarium*.

Por otra parte, la sexualidad y parasexualidad que puede ocurrir en *F. oxysporum* (Leslie, 1993) también puede contribuir a la transferencia lateral de genes de patogenicidad a cepas lejanamente relacionadas, lo que complica también su identificación a nivel de especie. La difusión horizontal de los cromosomas que lleva grupos de genes a través de distintos linajes evolutivos (Covert, 1998), podría explicar también por qué la misma maquinaria de patogenicidad se produce en diferentes clados del complejo de especies de *Fusarium* (Baayen, 2000). Los hongos tienen un genoma haploide que exhibe un alto grado de variación en cariotipos y pueden tener una duplicación segmental (Ma *et al.*, 2010). La transferencia horizontal de cromosomas dentro del complejo de especies contribuye potencialmente a la generación de variantes particularmente hacia nuevos patógenos. El movimiento de elementos transponibles (TEs) y reordenamientos cromosómicos causados por recombinación entre TE homologos dispersos alrededor del genoma son otros mecanismos que permiten la generación de nuevas variantes (Ma *et al.*, 2010).

6.3 Patogenicidad del complejo de especies de *F. oxysporum*

Los hongos patogénicos del suelo como *F. oxysporum* representan una amenaza para muchos cultivos. Una estrategia que ha protegido con éxito a algunos cultivos es la fumigación de los suelos, particularmente el uso de bromuro de metilo. Sin embargo, este está acabando con la capa de ozono. Por lo que es necesario estudios enfocados a la comprensión del complejo molecular de las interacciones que determinan la resistencia a enfermedades y la susceptibilidad entre el hongo y la raíz de la planta. Considerando las interacciones íntimas y dinámicas entre *F. oxysporum* y sus hospedantes, es necesaria la comprensión de los mecanismos moleculares subyacentes de la colonización y progresión de la enfermedad (O'Donnell *et al.*, 2009).

En el presente estudio fue posible identificar que representantes del complejo de especies de *F. oxysporum* utilizan mecanismos similares para causar la enfermedad en diferentes hospedantes, aun cuando los cultivos pertenecen a diferentes familias. Este comportamiento cosmopolita es debido a que se ha identificado que aislamientos de un mismo grupo tienen orígenes evolutivos independientes, lo que sugiere que la capacidad de infectar a una o más especies vegetales puede haber surgido de manera convergente (O'Donnell *et al.*, 1998). Los resultados sugieren que estas cepas tienen la capacidad de ocasionar diferentes tipos de daño e inclusive matar a algunas especies. Dicha capacidad se comprobó con los aislamientos empleados, los cuales ocasionaron muerte de plántulas en garbanzo, frijol, calabaza y jitomate. La presencia de la germinación de microconidios en diferentes especies de plantas, sugiere que estas cepas pueden crecer activamente en diferentes tejidos y pueden someterse a ciclos de conidiación en distintos hospedantes, como ha sido previamente reportado para *Fusarium* (Ortoneda *et al.*, 2004).

Este trabajo es el primer reporte de cepas aisladas de diferentes hospedantes y que tienen la capacidad de infectar a diferentes especies. La disponibilidad de este modelo multi-sistema

representa un paso clave hacia la comprensión de cómo la patogénesis fúngica ha evolucionado en diferentes hospedantes. Además, éste sistema planta: complejo *F. oxysporum*, podría ser un modelo útil para la identificación de virulencia de variantes de este complejo de hongos. Un estudio similar a estos resultados obtenidos fue realizado por Ortoneda *et al.* (2004). Los patógenos de plantas como *Fusarium* tienen la capacidad de presentar variaciones que pueden tener un impacto directo en su actividad biológica y su rol en el ambiente (Emokhonov *et al.*, 1993). Entre patógenos fúngicos que afectan a plantas, las variaciones pueden ocurrir en alguna etapa de crecimiento para cambiar su morfología o virulencia que determine su rango de hospedante (Van der Does *et al.*, 2008). Una característica de *Fusarium* es la producción de toxinas, compuestos que se han encontrado comunes en varias especies, así como familias de compuesto que son específicos para especies (Emokhonov *et al.*, 1993).

Cuando una planta es atacada por patógenos, una compleja red de mecanismos de defensa es activada para protección del daño. En las interacciones planta-patogeno compatible (es decir, susceptible) e incompatible (es decir, resistente), las plantas responden secretando sus propio grupo de proteínas. Estas proteínas relacionadas a patogénesis pueden causar daño directo invadiendo o jugando un rol de protección, por ejemplo a través de la inhibición de enzimas de degradación de pared celular secretadas por patógenos (Van Loon y Van Strien, 1999). Estudios han mostrado cambios en los niveles de expresión de las enzimas malato deshidrogenasa y superóxido dismutasa durante las interacciones compatible e incompatible (Mukherjee *et al.*, 2009; Mandal *et al.*, 2011). Las plantas tienen la capacidad de protegerse ante el ataque de infecciones fungosas y a otros factores bióticos y abióticos por diferentes vías. Las plantas se defienden mediante el fortalecimiento físico de la pared celular a través de la lignificación, suberización y producción de varias proteínas relacionadas a patogénesis (PR) incluyendo las enzimas hidrolíticas

quitinasa y β -1, 3-glucanasa que son muy importantes durante el ataque de patógenos (Ebrahim *et al.*, 2011).

6.4 Conclusiones

Los resultados obtenidos indican que los aislamientos GVS44, GVS48, GSa58 y GSa60 no pertenecen a las razas descritas para *Foc* pero presentan patotipos muy similares a los causados por éstas. Por lo tanto, este análisis sugiere que las razas de *Foc* involucran la acumulación escalonada y posible pérdida ocasional de virulencia a cultivares diferenciales. Los análisis filogenéticos con los diferentes genes mostraron resultados variables al compararlos con las cinco razas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* y las accesiones de referencia para esta misma especie.

El análisis de secuencias del gen TEF, ITS y mtSSU permitieron ubicar a los aislamientos en estudio en cuatro complejos de especies de *Fusarium*: *F. oxysporum*, *G. fujikuroi*, *F. incarnatum-equiseti* y *F. solani*, los cuales están involucrados en la enfermedad conocida como fusariosis en plantas de garbanzo. Dichos resultados indican, también, que los patotipos característicos de amarillamiento y marchitez están asociados al menos a cuatro complejos de especies de *Fusarium*. Los aislamientos (GSV48, MM25, CPC1 y CPC2) identificados dentro del complejo de especies de *F. oxysporum* de acuerdo al gen TEF, presentaron diferentes tipos de daño al inocularlos en los cultivos de calabaza, chile manzano, frijol, jitomate, garbanzo y maíz. Por lo anterior, es posible plantear que un solo aislamiento es capaz de causar daño en diferentes cultivos, aun cuando los aislamientos presentan diferentes orígenes geográficos y hayan sido aislados de diferentes hospedantes.

Los aislamientos representantes del complejo de especies de *F. oxysporum* tuvieron la capacidad de ocasionar daño en *C. annuum* y *C. pubescens*. La intensidad del daño fue diferente en los

cultivares empleados por lo que fue posible identificar a “Piquín” como susceptible y a CM334 como resistente a las cepas utilizadas de *F. oxysporum*. Por lo anterior, *F. oxysporum* puede ser un modelo útil para estudiar los mecanismos de virulencia e identificar las variantes en plantas susceptibles y resistentes.

6.5 Literatura citada

- Baayen R., P., O'Donnell K., J. M. Bonants P., Cigelnik E., N. M. Kroon L., P., J. A. Roebroeck E., Waalwijk C. 2000. Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic formae speciales causing wilt and rot disease. *Phytopathology* 90: 891–900.
- Covert S. F. 1998. Supernumerary chromosomes in filamentous fungi. *Current Genetics* 33:311-319.
- Dignani M., Anaissie E. 2004. Human fusariosis. *Clinical Microbiology and Infection* 10:67–75.
- Ebrahim S., K. Usha and Singh B. 2011. Pathogenesis Related (PR) Proteins in Plant Defense Mechanism. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. A. Méndez-Vilas (Ed.). pp. 1043-1054.
- Emokhonov V., N., N. Groznov I., A. Monastirskii O., Y. Permogorov A. 1993. Detection of grain infection with specific toxicogenous fungal species gas chromatography–mass spectrometric analysis of volatile metabolites. In: *Mass spectrometry for the characterization of microorganisms*, ACS Symposium Series, pp 85–90.
- Geiser D., M., M. M. Jiménez G., C. Kang S., Makalowska I., Veeraraghavan N., J. Ward T., Zhang N., A. Kulda G., O'Donnell K. 2004. Fusarium-ID v. 1.0: a DNA sequence database for identifying Fusarium. *European Journal Plant Pathology* 110: 473–479.

- Gerda F., N., A., V. Merwe., B. D. Wingfield., M. Bogale, B. Tudzynski., M. J. Wingfield., and E.T. Steenkamp. 2013. Evidence for inter-specific recombination among the mitochondrial genomes of *Fusarium* species in the *Gibberella fujikuroi* complex. *BMC Genomics* 14:605.
- Gordon T., R., D. Martyn R. 1997. The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. *Annual Review Phytopathology* 35:111-128.
- Hirano Y., Arie T. 2009. Variation and phylogeny of *Fusarium oxysporum* isolates based on nucleotide sequences of polygalacturonase genes. *Microbes Environmental* 24: 113-120.
- Jimenez G., M., M., G. Milgroom M., and R. M. Jimenez D. 2002. Gene genealogies support *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* as a monophyletic group. *Plant Pathology* 51: 72-77.
- Jiménez G., M., Mar., J. A. Navas C., R. M. Jiménez D. 2004. The *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*/ *Cicer arietinum* pathosystem: a case study of the evolution of plant-pathogenic fungi into races and pathotypes. *International Microbiology* 7: 95–104.
- Kristensen R., M. Torp., B. Kosiak., A. Holst J. 2005. Phylogeny and toxigenic potential is correlated in *Fusarium* species as revealed by partial translation elongation factor 1- α gene sequences. *Mycological Research* 109: 173–86.
- Leslie J., F. 1993. Fungal vegetative compatibility. *Annual Review Phytopathology* 31:127-151.
- Ma L., J., C. Van der Does H, A. Borkovich K., J. Coleman J., J. Daboussi M., Di Pietro A., Dufresne M., Freitag M., Grabherr M., *et al.* 2010. Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature* 464:367–373.
- Mandal S, K. Das R., S. Mishra. 2011. Differential occurrence of oxidative burst and antioxidative mechanism in compatible and incompatible interactions of *Solanum lycopersicum* and *Ralstonia solanacearum*. *Plant Physiology Biochemistry* 49: 117–123.

- Michielse C., B., Rep M. 2009. Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. Molecular Plant Pathology 10: 311-324.
- Mukherjee A., K., S. Lev, S. Gepstein., A. Horwitz B. 2009. A compatible interaction of *Alternaria brassicicola* with *Arabidopsis thaliana* ecotype DiG: evidence for a specific transcriptional signature. BMC Plant Biology 9: 31.
- O'Donnell K., A. Humber R., M. Geiser D., Kang S., Park B., R. G. Robert VA, Crous P. W, Johnston P., R., Aoki T., P. Rooney A., A. Rehner S. 2012. Phylogenetic diversity of insecticolous fusaria inferred from multilocus DNA sequence data and their molecular identification via FUSARIUM-ID and *Fusarium* MLST. Mycologia 104: 427–445.
- O'Donnell K., A. Sutton D., G. Rinaldi M., C. Magnon K., A. Cox P., G. Revankar S., Sanche S., M. Geiser D., H. Juba J., A. H. Van B., J., Padhye A., J. Anaissie E., Francesconi A., J. Walsh T., S. Robinson J. 2004. Genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium oxysporum* complex inferred from multilocus DNA sequence data and amplified fragment length polymorphism analyses: evidence for the recent dispersion of a geographically widespread clonal lineage and nosocomial origin. Journal Clinic Microbiology 42: 5109–5120.
- O'Donnell K., C. Kistler H., Cigelnik E., C Ploetz R. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 95: 2044–2049.
- O'Donnell K., C. Kistler H., K. Tacke B., H. Casper H. 2000. Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium*

- graminearum*, the fungus causing wheat scab. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 97: 7905–7910.
- O'Donnell K., Gueidan C., Sink S., Johnston P., R., Crous P., W., Glenn A., Riley R., Zitomer N., C., Colyer P., Waalwijk C., Lee Tvd., Moretti A., Kang S., S. Kim H., M. Geiser D., Juba J., H., Baayen R., P., Cromeij M., G., Bithel S., Sutton D., A., Skovgaard K., Ploetz R. 2009. A two-locus DNA sequence database for typing plant and human pathogens within the *Fusarium oxysporum* species complex. Fungal Genetic Biology 46: 936–948.
- O'Donnell K., Sarver B., Brandt M., C. Chang D., J. Nobel-W., J. Park B., Sutton D., Benjamin L., Lindsley M., Padhye A., M. Geiser D., J. Ward T. 2007. Phylogenetic diversity and microsphere array-based genotyping of human pathogenic fusaria, including isolates from the multistate contact lens-associated U.S. keratitis outbreaks of 2005 and 2006. Journal of Clinical Microbiology 45: 2235–2248.
- Ortoneda M., Guarro J., Madrid MP, Caracul Z, Roncero MIG, Mayayo E, Di Pietro A (2004) *Fusarium oxysporum* as a multihost model for the genetic dissection of fungal virulence in plants and mammals. Infection and Immunity 72:1760–1766.
- Van der Does H., C., G. E. Duyvesteyn R., M. Goltstein P, C. N. Van Schie C., M. M. Manders E., J. C. Cornelissen B., Rep M. 2008. Expression of effector gene SIX1 of *Fusarium oxysporum* requires living plant cells. Fungal Genetic Biology 45:1257–1264.
- Van Loon, L., C. and E. Van Strien A. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. Physiological Molecular Plant Pathology 55: 85–97.