

EVALUACION DE LA CAPACIDAD BENEFICA E IDENTIFICACION MOLECULAR DE CEPAS DE *Fusarium spp* AISLADAS DE PLANTAS DE MAIZ

Dr. Luis Roberto Reveles Torres
MC. Mayra Denise Herrera
Dra. Silvia Salas Muñoz
Dra. Fátima Berenice Salazar Badillo
Dr. Jorge Armando Mauricio Castillo



Centro de Investigación Regional Norte Centro
Campo Experimental Zacatecas
Calera de V.R, Zacatecas
Folleto Técnico No. 105
Diciembre 2019
ISBN: 978-607-37-1167-8

SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL

VÍCTOR MANUEL VILLALOBOS ARÁMBULA

Secretario de Agricultura y Desarrollo Rural del Gobierno de México

MIGUEL GARCÍA WINDER

Subsecretario de Agricultura

VÍCTOR SUÁREZ CARRERA

Subsecretario de Autosuficiencia Alimentaria

DAVID MONREAL ÁVILA

Coordinador General de Ganadería

SALVADOR FERNÁNDEZ RIVERA

Coordinador General de Desarrollo Rural

IGNACIO OVALLE FERNÁNDEZ

Titular del Organismo Seguridad Alimentaria Mexicana

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES FORESTALES, AGRÍCOLAS Y PECUARIAS

DR. JOSÉ FERNANDO DE LA TORRE SÁNCHEZ

Director General

DR. JOSÉ ANTONIO CUETO WONG

Coordinador de Investigación, Innovación y Vinculación

M.C. JORGE FAJARDO GUEL

Coordinador de Planeación y Desarrollo

LIC. JOSÉ HUMBERTO CORONA MERCADO

Coordinador de Administración y Sistemas

CENTRO DE INVESTIGACIÓN REGIONAL NORTE CENTRO

DR. ARTURO DANIEL TIJERINA CHÁVEZ

Director Regional

DR. FRANCISCO JAVIER PASTOR LÓPEZ

Director de Investigación

ING. RICARDO CARRILLO MONSIVÁIS

Director de Administración

MC. RICARDO A. SÁNCHEZ GUTIÉRREZ

Director de Coordinación y Vinculación en Zacatecas

EVALUACION DE LA CAPACIDAD BENEFICA E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE *Fusarium spp* AISLADAS DE PLANTAS DE MAIZ

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
Progreso No. 5, Barrio de Santa Catarina
Delegación Coyoacán
México, D.F.
C.P. 04010 México, D.F. Teléfono
(55) 3871-8700

ISBN: 978-607-37-1167-8

Primera Edición: DICIEMBRE 2019

No está permitida la reproducción total o parcial de esta publicación, ni la transmisión de ninguna forma o por cualquier medio, ya sea electrónico, mecánico, fotocopia o por registro u otros métodos, sin el permiso previo y por escrito a la institución.

Cita correcta:

Reveles-Torres L.R., Herrera M.D., Salas-Muñoz S., Salazar-Badillo F.B., Mauricio-Castillo J.A. Evaluación de la capacidad benéfica e identificación molecular de cepas de *Fusarium spp* aisladas de plantas de maíz. Folleto Técnico Núm 105. Campo Experimental Zacatecas. CIRNOC – INIFAP, 29 páginas.

CONTENIDO

INTRODUCCION	1
MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
Identificación y cultivo de hongos	3
Extracción de ADN genómico de hongos	3
Amplificación de la región intergénica del hongo mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	4
Ligación de los productos de PCR y transformación por choque térmico en células de <i>Escherichia coli</i>	5
Extracción de ADN plasmídico y confirmación del inserto en el vector.....	5
Secuenciación y análisis del ITS de hongo.....	5
Evaluación de la interacción directa de los hongos con plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	6
RESULTADOS	7
Aislamientos	7
Capacidad benéfica.....	9
Identificación molecular	14
Análisis de las secuencias obtenidas y comparación con las presentes en la base de datos del GenBank.....	16
DISCUSIÓN	18
CONCLUSIÓN	22
PERSPECTIVAS.....	23
LITERATURA CITADA	24

EVALUACION DE LA CAPACIDAD BENEFICA E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE *Fusarium spp* AISLADAS DE PLANTAS DE MAIZ

Dr. Luis Roberto Reveles Torres¹

MC. Mayra Denise Herrera¹

Dra. Silvia Salas Muñoz²

Dra. Fátima Berenice Salazar Badillo³

Dr. Jorge Armando Mauricio Castillo³

INTRODUCCION

Las plantas establecen relaciones con microorganismos bajo condiciones naturales, estas relaciones pueden ser benéficas o patogénicas, dependiendo de los microorganismos y las condiciones ambientales en las que estas interacciones estén sucediendo. En los últimos 50 años, se ha reportado que diferentes especies de microorganismos aislados de la rizósfera, al ser reintroducidos en campo pueden producir un efecto benéfico de promoción de crecimiento tanto en las plantas de las que fueron aisladas como en otras. Hay una gran variedad de hongos de diferentes generos identificados que actúan como benéficos como son *Trichoderma* (Schuster y Schmoll, 2010), *Penicillium* (Babu *et al.*, 2015), *Glomus spp* (Whipps *et al.*,

¹ Investigadores del Programa de Biología Molecular, y del Programa de Fitopatología del Campo Experimental Zacatecas. ²Investigador Catedrático CONACYT-Campo Experimental Zacatecas. ³Docente-Investigador de la Unidad Académica de Agronomía UAZ.

2004), entre otros. Sin embargo, uno de los géneros que ha sido poco estudiado es *Fusarium spp*, ya que la mayoría de las especies son patogénicas para plantas, animales y humanos.

Actualmente, existen pocos reportes del genero de *Fusarium spp* como promotor de crecimiento vegetal, tal es el caso de *F. oxysporum* y *F. equiseti*, que promueven el crecimiento en lechuga y pepino, respectivamente (Thongkamngam y Jaenaksorn, 2017, Saldajeno y Hyakumachi, 2011).

En un trabajo previo se aislaron a partir de tallo y raíz diversas colonias de hongos filamentosos provenientes de plantas enfermas de maíz en el estado de Aguascalientes, con manifestaciones de diferente grado de desarrollo de pudrición de tallo relacionada a *Fusarium spp*, así como de plantas aparentemente sanas de maíz, con la finalidad de identificar la variabilidad molecular y grado de virulencia de los posibles agentes causantes de la enfermedad.

Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad benéfica de estas cepas aisladas de maíz, utilizando

como modelo *Arabidopsis thaliana*, así como identificar las mismas mediante técnicas moleculares a nivel de especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

Identificación y cultivo de hongos

Para la identificación del genero de *Fusarium spp* de las cepas de los hongos aislados, se utilizaron las claves descritas por Nelson *et al.* (1983), que consiste en utilizar aislamientos monosporicos y observar las estructuras en el microscopio. Este trabajo lo realizó la Dra. Dolores Briones en el Campo Experimental de Pabellón Arteaga del INIFAP.

Las cepas de los hongos fueron cultivadas en medio Agar Papa Dextrosa (PDA), de los cuales se realizaron réplicas de todos los hongos con los que se trabajaron. Se cortó el agar con el hongo y se transfirieron a cajas nuevas con PDA, y se incubaron a 28 °C durante 8 días.

Extracción de ADN genómico de hongos

Se congeló el micelio con nitrógeno líquido, y este se macero en un mortero frío hasta obtener un polvo fino, éste se transfirió a un tubo eppendorf para continuar con el protocolo de extracción que se maneja en el laboratorio de Diagnóstico Molecular en Sanidad

Vegetal del Campo Experimental Zacatecas. Se evaluó la calidad e integridad del gADN mediante la lectura en un nanodrop (Thermo Scientific™ NanoDrop™ 2000c) y por electroforesis en geles de agarosa al 2%.

Amplificación de la región intergénica del hongo mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La identificación de cada uno de los hongos, se basó en la amplificación de la región intergénica (ITS; internal transcribed spacer) del ADN ribosomal 18S en hongos, ya que estas regiones varían entre género y especie. Para ello, se amplificó el ITS mediante PCR y se utilizaron los siguientes oligonucleótidos:

ITS-4 Fw 5'–TCCTCCGCTTATTGATATGC–3'

ITS-5 Rv 5'–GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG–3'

(White *et al.*, 1990), los cuales amplifican un fragmento aproximadamente de 600 pb que abarca la región ITS-1 e ITS-2 y el gen 5.8S del rDNA.

El programa del termociclador utilizado fue: desnaturalización inicial de cinco min a 94°C, seguida de 35 ciclos de 30 s a 94°C, 45 s a 60 °C, y 1.5 min a 72 °C, con una extensión final de ocho min a 72 °C en un termociclador marca Bio-Rad.

Ligación de los productos de PCR y transformación por choque térmico en células de *Escherichia coli*

Cada uno de los productos de 600 pb correspondientes a la región del ITS de hongo, se clonaron en el vector pGEM-T Easy y se transformaron en células de *E. coli* por choque térmico. Los procedimientos se realizaron en base a la metodología descrita por Santos-Rodríguez con algunas modificaciones.

Extracción de ADN plasmídico y confirmación del inserto en el vector

Después de plaquear la transformación, se seleccionaron las colonias blancas, las cuales contienen el plásmido (vector más inserto) y se prosiguió a realizar los pre-inóculos para poder extraer el ADN plasmídico de cada uno de los minipreps. Una vez aislado el ADN plasmídico (clonas), se confirmó mediante PCR el producto de amplificación del ITS de cada uno de los hongos.

Secuenciación y análisis del ITS de hongo

Las clonas positivas (las cuales se presume que tienen el fragmento de 600 pb correspondiente a la región ITS específico del hongo), se mandaron a secuenciar al Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Medica y Ambiental (LANBAMA) en

San Luis Potosí. Las secuencias obtenidas se compararon en la base de datos del GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI), utilizando el programa Blastn.

Evaluación de la interacción directa de los hongos con plántulas de *Arabidopsis thaliana*.

Para la germinación de las semillas de *A. thaliana*, primero se esterilizaron con 500 μ L de cloro al 20% en agitación a 1,000 rpm durante cinco minutos, después se retiró el cloro y se prosiguió a lavar las semillas agregando agua destilada estéril en agitación por cinco minutos a 1,000 rpm, este paso se repitió cinco veces. Las semillas esterilizadas se colocaron a 4°C por tres días para vernalización, transcurrido el tiempo se sembraron en cajas Petri que contienen medio MS 0.2X (Murashigue y Skoog; Phyto Technology Laboratories), agar al 1% y sacarosa al 0.6% ajustado a un pH de 7. Las cajas Petri con las semillas de *A. thaliana*, se colocaron verticalmente en un ángulo de 70° en cámaras bioclimáticas con fotoperiodos de 16 horas de luz y ocho de oscuridad a una temperatura de 23 ± 2 °C durante siete días, para permitir su crecimiento. Posteriormente, para la interacción directa de los hongos de *Fusarium* spp con *Arabidopsis thaliana*, se cortó un trozo homogéneo de cada uno de los hongos y se

colocaron en la parte inferior de las cajas Petri con las ocho plántulas de *A. thaliana* a los diez días de edad, y se colocaron de nuevo en cámaras de crecimiento bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente.

RESULTADOS

Aislamientos

Se aislaron un total de 37 cepas de hongos pertenecientes al género de *Fusarium* spp, causante de la pudrición de tallo, raíz y mazorca en plantas de maíz (*Zea mays*). En la Tabla 1, se muestran los datos de las 37 cepas de hongos, de las cuales 17 y 12 fueron aisladas de tallo y raíz, respectivamente de plantas enfermas, cuatro de tallo y una de raíz, de plantas sanas y tres de semillas enfermas, además el porcentaje de incidencia fue entre 2 al 100 % de la enfermedad.

Tabla 1. Cepas de hongos aislados de semillas y planta de maíz.

Núm	Lugar	Tejido	Incidencia (%)	Aislados
1	Pabellón de Arteaga-INIFAP Lote Eval-2016	T/E	100	P3.T
2	Pabellón de Arteaga-INIFAP Lote Eval-2016	T/S	2	P4.TS

3	Pabellón de Arteaga-INIFAP Lote Eval-2016	T/E	13	P33.T
4	Pabellón de Arteaga-INIFAP Lote Eval-2016	T/S	0	P34.TS
5	Pabellón de Arteaga-INIFAP Lote Eval-2016	T/E	68	P70.T,
6	Pabellón de Arteaga-INIFAP Lote Eval-2016	T/E	76	P85.T
7	Pabellón de Arteaga-INIFAP Lote Eval-2016	T/E	76	P85.1.T
8	Pabellón de Arteaga-INIFAP Lote Eval-2016	T/S	0	P86.TS
9	Pabellón de Arteaga-INIFAP Lote Eval-2016	T/S	0	P119.TS
10	San Francisco de los Romo 2017	R/E	30	M1.1.R
11	San Francisco de los Romo 2017	R/E	30	M1.3.R
12	Hacienda, Teocaltiche, Jalisco	T/E	12	M2.1E.T
13	Hacienda, Teocaltiche, Jalisco	R/E	12	M2.1E.R
14	Hacienda, Teocaltiche, Jalisco	R/S	12	M2.2S.R
15	Hacienda, Teocaltiche, Jalisco	R/E	12	M2.3R
16	Cuatro cienegas, Salitrillo, Rincón de Romos, 2017	T/E	40	M3.1.1.T
17	Cuatro cienegas, Salitrillo, Rincón de Romos, 2017	R/E	40	M3.2.R
18	Salitrillo, Rincón de Romos, 2017	T/E	40	M3.2.T
19	Granja Galilea Pozo 19, Pabellón de Arteaga, 2017	T/E	-	M4.1.1.T
20	Granja Galilea Pozo 19, Pabellón de Arteaga, 2017	T/E	-	M4.1.R
21	Granja Galilea Pozo 19, Pabellón de Arteaga, 2017	T/E	-	M4.2.T
22	Pabellón de Arteaga-INIFAP Lote Eval-2017	T/E	100	M5.1.1.T

23	Pabellón de Arteaga-INIFAP Lote Eval-2017	R/E	100	M5.1.1.R
24	Pabellón de Arteaga-INIFAP Lote Eval-2017	SEM/E	100	M5.SEM
25	Pabellón de Arteaga-INIFAP Lote Eval-2017	R/E	60	M6.1R
26	Pabellón de Arteaga-INIFAP Lote Eval-2017	R/E	60	M6.2R
27	Pabellón de Arteaga-INIFAP Lote Eval-2017	T/E	60	M6.2.1T
28	Pabellón de Arteaga-INIFAP Lote Eval-2017	R/E	100	M7.1R
29	Pabellón de Arteaga-INIFAP Lote Eval-2017	R/E	100	M7.2.1R
30	Pabellón de Arteaga-INIFAP Lote Eval-2017	SEM/E	100	M7.SEM
31	Pabellón de Arteaga-INIFAP Lote Eval-2017	R/E	100	M8.2.R
32	Pabellón de Arteaga-INIFAP Lote Eval-2017	R/E	50	M9.1.R
33	Pabellón de Arteaga-INIFAP Lote Eval-2017	SEM/E	50	M9.SEM
34	Salitrillo Rincón de Romos 2017	T/E	30	M10.2.T
35	Salitrillo Rincón de Romos 2017	T/E	30	M10.2.R
36	Salitrillo Rincón de Romos 2017	T/E	30	M10.3.T
37	Salitrillo Rincón de Romos 2017	T/E	30	M11.T

M: Muestra, R: Raíz, T: Tallo, SEM: Semilla, S: Sano, P: Planta

Capacidad benéfica

Para evaluar la capacidad benéfica o patogénica de las cepas de los hongos, se estableció la interacción planta-microorganismo.

Para esto, se utilizaron ocho plántulas de *Arabidopsis thaliana* de diez días de edad, las cuales fueron inoculadas con cada una de las cepas aisladas de los hongos, con la finalidad de observar el fenotipo de desarrollo y crecimiento de las plántulas. Los resultados de la interacción mostraron que, de las 37 cepas de los hongos aislados de maíz, 21 cepas mostraron efectos benéficos sobre las plántulas de *Arabidopsis*. En la Figura 1, se observa el fenotipo de las plántulas de *Arabidopsis* a los 12 días después de la inoculación (dpi) con 21 cepas benéficas, donde se observa que las plántulas mostraron un mayor crecimiento y desarrollo de la parte aérea, además un incremento en el desarrollo de las raíces secundarias, comparadas con las plántulas sin inocular (control).

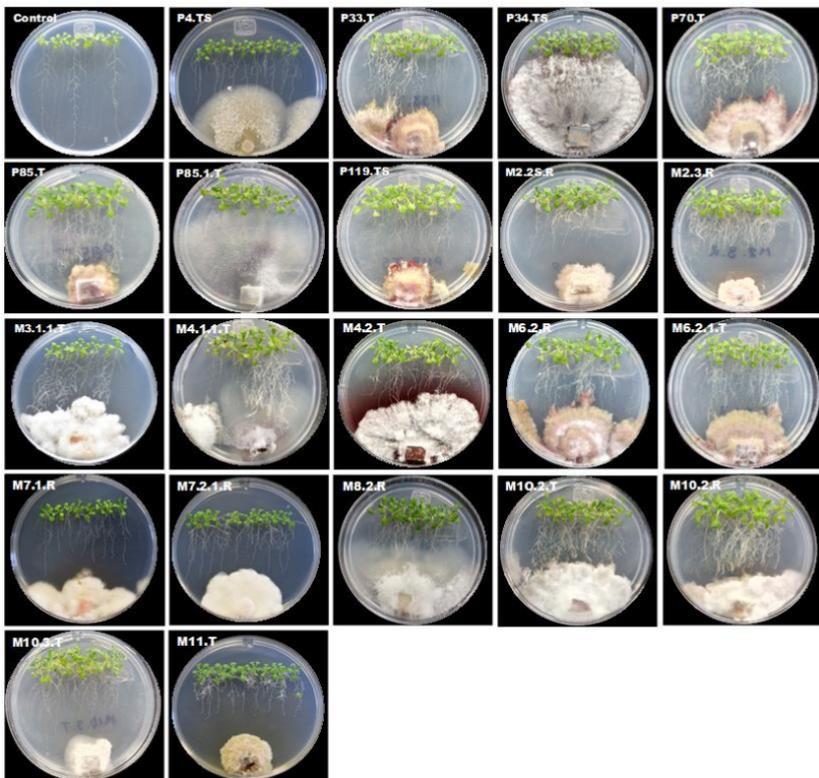


Figura 1. Análisis del fenotipo de crecimiento y desarrollo vegetal de 21 cepas de hongos del genero de *Fusarium spp* en *A. thaliana* a los 12 dpi. Plántulas sin inocular (Control) y Plántulas inoculadas con las 21 cepas de hongos aislados de maíz (P4.TS, P33.T, P34.TS, P70T, P85.T, P85.1.T, P119.TS, M2.2S.R, M2.3.R, M3.1.1.T, M4.1.1.T, M4.2.T, M6.2.R, M6.2.1.T, M7.1.R, M7.2.1.R, M8.2.R, M10.2.T, M10.2.R, M10.3.T y M11.T).

El resto de las cepas de los hongos mostraron efectos patogénicos en plántulas de *Arabidopsis*. En la Figura 2, se observa el fenotipo de las plántulas con las 16 cepas de hongos patogénicos para *A.*

thaliana, los cuales mostraron una disminución en el crecimiento y desarrollo, así como síntomas de clorosis, amarillamiento, y la presencia de manchas moradas en la base de las hojas (producción de antocianinas), en comparación con las plantas no inoculadas (control).

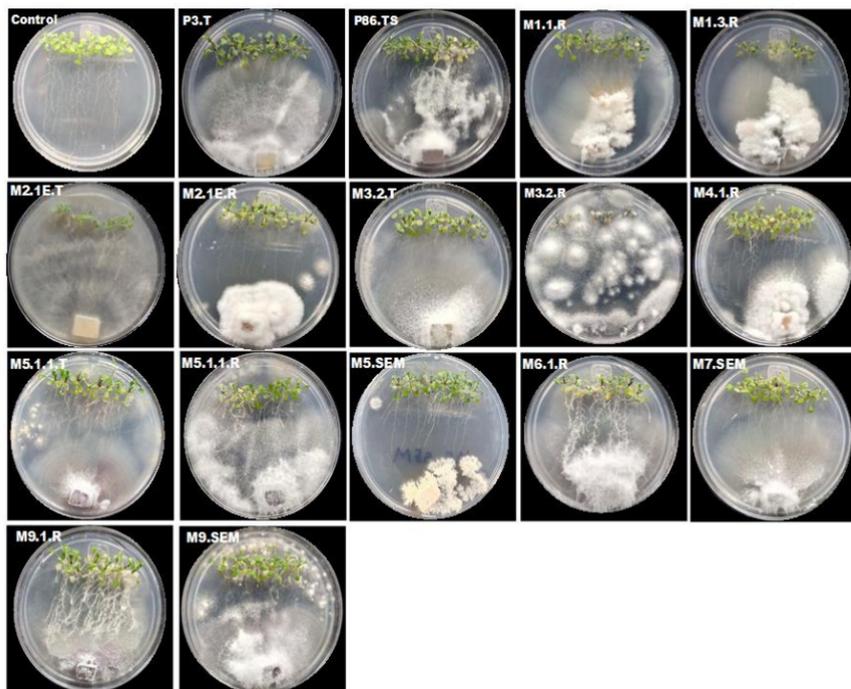


Figura 2. Análisis del fenotipo de crecimiento y desarrollo vegetal de 16 cepas de hongos del genero de *Fusarium* spp en *A. thaliana* a los 12 dpi. Plántulas sin inocular (Control) y Plántulas inoculadas con las 16 cepas de hongos aislados de maíz (P3.T, P86.TS, M1.1.R, M1.3.R, M2.1E.T, M2.1E.R, M3.2.T, M3.2.R, M4.1.R, M5.1.1.T, M5.1.1.R, M5.SEM, M6.1.R, M7.SEM, M9.1.R y M9.SEM).

En la Figura 3, se muestra la gráfica de los pesos (g) de ocho plántulas de *Arabidopsis* en interacción con las 37 cepas aisladas de plantas de maíz. Las cepas PP33.T, P34.TS, P70T, P85.T, P85.1.T, P119.TS, M2.2S.R, M2.3.R, M3.1.1.T, M4.1.1.T, M4.2.T, M6.2.R, M6.2.1.T, M7.1.R, M8.2.R, M10.2.T, M10.2.R y M10.3.T, que resultaron ser benéficas, mostraron un incremento en el peso de las plántulas comparados con el control, excepto las cepas P4.TS, M7.2.1R y M11.T (Figura 3), sin embargo, se consideraron como benéficas ya que al observar el fenotipo no hubo algún síntoma de daño (véase Fig. 1). Respecto a las cepas P86.TS, M1.1.R, M1.3.R, M2.1E.T, M2.1E.R, M3.2.T, M3.2.R, M4.1.R, M5.1.1.T, M5.1.1.R, M5.SEM, M6.1.R y M7.SEM, los pesos fueron menor que las plantas control, excepto las cepas P3.T, M9.1.R y M9.SEM (Figura 3). Sin embargo, se consideraron patogénicas debido a que al observar el fenotipo mostraron síntomas de clorosis, amarillamiento y producción de antocianinas (véase Figura 2).

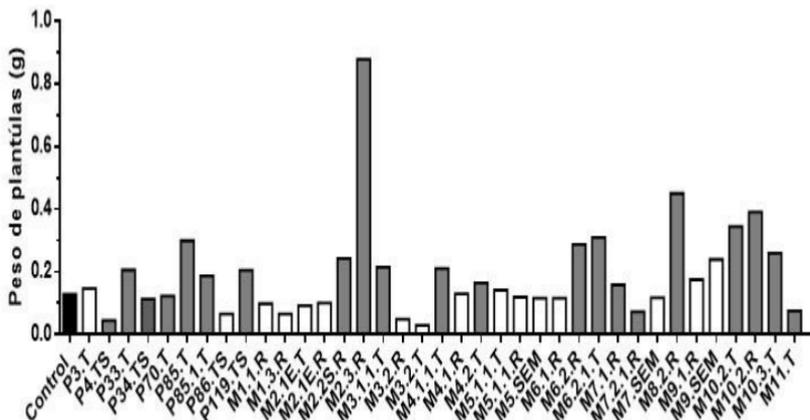


Figura 3. Grafica de los pesos de plántulas de *Arabidopsis thaliana* en interacción con las 37 cepas de *Fusarium spp* Peso en gramos de 8 plántulas de *A. thaliana* sin inocular (Control; barra en color negro), e inoculadas con las 21 cepas benéficas (P4.TS, P33.T, P34.TS, P70T, P85.T, P85.1.T, P119.TS, M2.2S.R, M2.3.R, M3.1.1.T, M4.1.1.T, M4.2.T, M6.2.R, M6.2.1.T, M7.1.R, M7.2.1.R, M8.2.R, M10.2.T, M10.2.R, M10.3.T y M11.T; barras en color gris) y las 16 cepas patógenas (P3.T, P86.TS, M1.1.R, M1.3.R, M2.1E.T, M2.1E.R, M3.2.T, M3.2.R, M4.1.R, M5.1.1.T, M5.1.1.R, M5.SEM, M6.1.R, M7.SEM, M9.1.R y M9.SEM; barra en color blanco).

Identificación molecular

La identificación específica de las especies de *Fusarium spp* aisladas de plantas maíz, se llevó a cabo mediante técnicas moleculares, las cuales permiten amplificar la región intergénica (ITS) de los genes ribosomales, la cual varía entre género y especie. Por lo tanto, se extrajo el ADN de las 21 cepas de hongos que mostraron tener un efecto benéfico en *A. thaliana*. A partir

del ADN se realizó el PCR con oligonucleótidos específicos para la región ITS, los cuales amplifican un tamaño de banda de 600 pb aproximadamente. En la Figura 4, se muestran los resultados del gel de PCR de 13 muestras analizadas (P4.TS, P33.T, P34.TS, P70T, P85.T, P85.1.T, P119.TS, M2.2S.R, M2.3.R, M3.1.1.T, M4.1.1.T, M4.2.T y M6.2.R), en donde se observa la amplificación de una banda de 600 pb, que corresponde al ITS de hongos.



Figura 4. Amplificación del ITS de las cepas de los hongos aislados de maíz mediante la PCR. Carril M: Marcador de peso Molecular 1 kb; Carriles 2-14: muestras de las cepas P4.TS, P33.T, P34.TS, P70T, P85.T, P85.1.T, P119.TS, M2.2S.R, M2.3.R, M3.1.1.T, M4.1.1.T, M4.2.T y M6.2.R; Carril 15: Control negativo (agua).

Cabe mencionar que el mismo procedimiento se realizó para las cepas M6.2.1.T, M7.1.R, M7.2.1.R, M8.2.R, M10.2.T, M10.2.R, M10.3.T y M11.T, dando como resultado la amplificación de la región del ITS (datos no mostrados). Posteriormente, los productos de PCR de las 21 cepas de hongos, se clonaron en el vector pGEM-T Easy, y se transformaron por método de choque térmico en células competentes TOP-10 de *Escherichia coli*. Después, se extrajo el ADN plasmídico de las colonias blancas mediante la técnica de minipreps. Es importante señalar que las cepas P85.1.T, M7.2.1.R, M7.1.R, M4.2.T y M11.T, no se obtuvieron clonas para mandar secuenciar.

Análisis de las secuencias obtenidas y comparación con las presentes en la base de datos del GenBank

Para la secuenciación de las clonas, se seleccionaron tres clonas de cada ligación, y se mandaron a secuenciar al Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA) en el estado de San Luis Potosí. Los resultados obtenidos fueron las secuencias, las cuales se ensamblaron y editaron usando DNASTAR Lasergene EditSeq versión 7.1.0. De esta manera, las secuencias se compararon con las secuencias depositadas en el GenBank del National Center for

Biotechnology Information (NCBI), mediante el programa Blastn. Los resultados de la secuenciación fue que las 16 cepas pertenecen al género de *Fusarium* spp, de las cuales fueron: *F. napiforme* (1), *F. gaminearum* (3), *F. lichenicola* (1), *F. cf graminearum* (1), *F. oxysporum* (2), *F. acuminatum* (1), *F. equiseti* (5), *F. rodolens* (1) y *Gibberella moniliformis* (1). En la Tabla 2, se enlista la identificación de las especies de las cepas de *Fusarium*, así como el porcentaje de identidad y el número de acceso del NCBI de cada una de ellas.

Tabla 2. Resultados de secuenciación de las cepas de los hongos aislados de maíz.

Hongo	Identificación	% Identidad	Acceso
P4.TS	<i>Fusarium napiforme</i>	100	MH874278.1
P33.T	<i>Fusarium graminearum</i>	99	HG970335.2
P34.TS	<i>Fusarium lichenicola</i>	99	AY154716.1
P70.T	<i>Fusarium graminearum</i>	100	HG970335.2
P85.T	<i>Fusarium cf graminearum</i>	100	HG970335.2
P119.TS	<i>Fusarium oxisporum</i>	99	KJ082096.1
M2.2S.R	<i>Fusarium acuminatum</i>	99	EU177123.1
M2.3.R	<i>Fusarium equiseti</i>	100	HQ630996.1
M3.1.1.T	<i>Fusarium equiseti</i>	100	KR094440.1
M4.1.1.T	<i>Gibberella moniliformis</i>	94	CP032052.1
M6.2.R	<i>Fusarium oxisporum</i>	100	HG936879.1

M6.2.1.T	<i>Fusarium graminearum</i>	100	HG970335.2
M8.2.R	<i>Fusarium equiseti</i>	100	KR094440.1
M10.2.T	<i>Fusarium equiseti</i>	100	KR094440.1
M10.2.R	<i>Fusarium equiseti</i>		
M10.3.T	<i>Fusarium redolens</i>	98	KY910892.1

DISCUSIÓN

En el suelo existe una gran variedad microorganismos interactuando de una manera benéfica y/o perjudicial para las plantas. Diversos estudios han realizado el aislamiento de microorganismos de la rizosfera de una gran variedad de plantas con importancia económica, y han determinado sí alguno de los aislados puede ser considerado como un microorganismo benéfico con el fin de obtener un biofertilizante o inoculo para incrementar el rendimiento del cultivo (Amaresan *et al.*, 2012; Allu *et al.*, 2014; Kumar y Audipudi, 2015). En varios estudios, se reportan una gran cantidad de cepas de microorganismos que se consideran benéficos, como son algunas especies del género *Trichoderma* (Schuster y Schmoll, 2010), *Penicillium* (Babu *et al.*, 2015), *Glomus* spp (Whipps *et al.*, 2004), *Pseudomonas* (Richardson *et al.*, 2001, Mehnaz *et al.*, 2006), *Rhizobium* (Huang *et al.*, 2007), entre otros. Otro de los géneros que se tiene escasa

información como promotores de crecimiento es *Fusarium* spp y *Alternaria* spp, ya que la mayoría son patógenos (Thongkamngam y Jaenaksorn, 2017, Zhou *et al.* 2018).

En un trabajo previo en el 2016 y 2017, se colectaron y aislaron 37 cepas del genero de *Fusarium* spp en lotes de plantas de maíz con incidencia superior al 30% hasta el 100% de la enfermedad de podredumbre del maíz, en el Estado de Aguascalientes en el Campus Pabellon, INIFAP (datos no publicados). Por lo tanto, nuestro objetivo fue evaluar la capacidad benéfica de las 37 cepas, así como realizar la identificación molecular de la especie de cada una de las cepas del genero *Fusarium* spp aisladas de raíz, tallo y semillas de maíz.

Los resultados de la evaluación de la capacidad benéfica y/o patogénica de las cepas al estar en contacto con *Arabidopsis thaliana*, se identificaron 21 cepas benéficas y 16 cepas patogénicas. Las plantas con cepas benéficas no mostraron algún daño en su crecimiento y ni en su desarrollo, incluso algunas de las éstas mostraron efectos de promoción de crecimiento. En cambio, con las cepas patogénicas las plantas de *Arabidopsis* mostraron daños (amarillamiento y clorosis).

Es importante señalar que las cepas que resultaron ser benéficas en *Arabidopsis*, fueron aisladas de plantas enfermas de maíz. Esto pudiera darse por diferentes factores como es el tipo de planta (dicotiledonea o monocotiledonea), la interacción planta-microorganismo, las condiciones del suelo, entre otras. Las cepas que ejercieron un efecto negativo en plantas de maíz (planta monocotiledónea), en las plantas de *Arabidopsis* (planta dicotiledónea) ejercieron un efecto positivo.

De las 21 cepas benéficas en *A. thaliana* que fueron previamente identificadas por su morfología a nivel de género positivo para *Fusarium* spp, el siguiente paso fue la identificación de la especie de los *Fusarium* spp, mediante técnicas moleculares, ya que son las herramientas más confiables para la identificación de organismos a nivel de especie. Los resultados de la secuenciación de las 16 cepas, fue que pertenecen al género de *Fusarium* spp, de las cuales se identificaron las especies de *F. napiforme* (1), *F. graminearum* (3), *F. lichenicola* (1), *F. cf graminearum* (1), *F. oxysporum* (2), *F. acuminatum* (1), *F. equiseti* (5), *F. rodolens* (1) y *Gibberella moniliformis* (1). La información reportada de las especies que fueron identificadas de *Fusarium* spp, es que las cepas de *F. graminearum* y *F. oxysporum*, están asociadas a la

enfermedad de pudrición del tallo en maíz (Ares *et al.*, 2004, Avedi *et al.*, 2014). Las especies de *F. rodolens*, *F. oxysporum*, *F. equiseti* y *F. napiforme*, han sido reportados que son causantes de enfermedades en cultivos como esparrago, pepino, cebada sorgo (Marasas *et al.*, 1987; Baayen *et al.*, 2000; Maciá-Vicente *et al.*, 2009; Nosrati *et al.*, 2011).

Los hongos del género *Fusarium* spp son caracterizados principalmente por ser patógenos, por lo tanto, el efecto benéfico de este género no está ampliamente descrito, como ocurre con algunas cepas del género *Trichoderma* (Benítez *et al.*, 2004).

La multifuncionalidad de los microorganismos en los sistemas agrícolas, se expresa de acuerdo a una serie de factores bióticos, como la competencia con otros microorganismos, la composición biológica del suelo, el reconocimiento planta microorganismo y viceversa. Igualmente, factores abióticos, como el clima, las características físicas y químicas del suelo, que influyen directamente en el tipo de interacción de estos organismos y la expresión de los efectos benéficos o detrimentales, los cuales son determinantes en el desarrollo de las especies vegetales

(Marschner y Timonen, 2005; Harman, 2006; Hoitink *et al.* 2006; Siddiqui y Akhtar, 2008; Radjacommare *et al.* 2010).

La interacción de microorganismos rizosféricos, como los hongos formadores de micorrizas arbusculares (AMF), hongos del género *Trichoderma* y bacterias del género *Pseudomonas*, usualmente catalogados como agentes de control biológico (BCA) y microorganismos promotores del crecimiento vegetal (PGPM), dependen de este tipo de factores para expresar sus potenciales efectos benéficos; sin embargo, las interacciones entre los microorganismos son complejas y se pueden presentar efectos sinérgicos que potencialicen los beneficios para la planta o, por el contrario, efectos antagónicos o, simplemente, que no ocurra ningún efecto. Este fenómeno podría incidir en las cepas de *Fusarium* como benéficas, apoyado por los resultados que en este estudio mostraron en plántulas de *Arabidopsis*.

CONCLUSIÓN

Se evaluó la capacidad benéfica y/o patogénica de las 37 cepas de *Fusarium* spp aisladas de plantas de maíz, de las cuales 21 cepas mostraron efectos benéficos en el desarrollo y crecimiento

(peso fresco) de las plántulas de *Arabidopsis thaliana*, y mientras que el resto fueron patogénicas observando síntomas de clorosis, amarillamiento, así como la reducción del crecimiento y desarrollo de las plántulas.

Se identificaron molecularmente las siguientes especies del genero de *Fusarium* spp: 1 de *F. napiforme*. (P4.TS), 3 de *F. graminearum* (P33.T, P70.T y M6.2.1.T), 1 de *F. cf graminearum* (P85.T), 2 de *F. oxysporum* (P119.TS y M6.2.R), 5 de *F. equiseti* (M2.3.R, M3.1.1.T, M8.2.R, M10.2.T y M10.2.R), 1 de *F. redolens* (M10.3.T), 1 de *F. lichenicola* (P34.TS), 1 de *F. acuminatum* (M2.2S.R) y 1 *Gibberella moniliformis* (M4.1.1.T).

PERSPECTIVAS

- Corroborar la identificación molecular de las cepas con otros marcadores moleculares como el factor uno alfa de la elongación (*EF-1 α*).
- Evaluar la capacidad de promoción de crecimiento vegetal de las cepas benéficas de *Fusarium* spp en plantas de importancia económica frijol, chile, maíz entre otros que generen beneficios a los productores.

LITERATURA CITADA

- Allu, S., Kumar, N. P. Audipudi, A. V. (2014). Isolation, biochemical and pgp characterization of endophytic pseudomonas aeruginosa isolated from chill red fruit antagonistic against chilli anthracnose disease. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. 3(2);318-329.
- Amaresan, N., Jayakumar, V., Kumar, K. & Thajuddin, N. (2012). Endophytic bacteria from tomato and chilli, their diversity and antagonistic potential against *Ralstonia solanacearum*. Journal Archives of Phytopathology and Plant Protection. 45(3);344-355.
- Ares, A., Ferro, A., Ramirez, C. & González, M. (2004). Short communication. *Fusarium graminearum* Schwabe, a maize root and stalk rot pathogen isolated from lodged plants in Northwest Spain. Spanish Journal of Agricultural Research. 2(2); 249-252.
- Avedi, E.K., Ochieno, D.M.W., Ajanga, S., Wanyama, C., Wainwright, H., Elzein, A., Beed, F., (2014). *Fusarium oxysporum f. sp. strigae* strain Foxy 2 did not achieve biological control of *Striga hermonthica* parasitizing maize in Western Kenya. Biol. Control 77; 7–14.

- Baayen, R., van den Boogert, P., Bonants, P. et al. (2000). *Fusarium redolens* f.sp. *asparagi*, causal agent of asparagus root rot, crown rot and spear rot. European Journal of Plant Pathology. 106: 907-912
- Babu, A.G., Kim, S.W., Yadav, D.R., Hyum, U., Adhikari, M., Lee, Y.S. (2015). *Penicillium menonorum*: A Novel Fungus to promote growth and nutrient management in cucumber plants. Mycobiology. 43(1): 49–56.
- Benítez, T., Delgado-Jarana, J., Rincón, A.M., Rey, M., Limón, M.C. (1998). Biofungicides: *Trichoderma* as a biocontrol agent against phytopathogenic fungi. En: Pandalai SG (ed), pp. 129-150. Recent developments in microbiology. Vol. 2. Research Signpost, Trivandrum. India.
- Harman, G.E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. Phytopath. 96:190-194.
- Hoitink, H.A.J.; Madden, L.V.; Dorrance, A.E. 2006. Systemic resistance induced by *Trichoderma* spp: Interactions between the host, the pathogen, the biocontrol agent, and soil organic matter quality. Phytopath. 96:186-189.
- Huang, H.C., Erickson, R.S (2007). Effect of seed treatment with *Rhizobium leguminosarum* on *Pythium* damping-off, seedling height, root nodulation, root biomass, shoot

- biomass, and seed yield of pea and lentil. *Journal of Phytopathology*. 155:31–37.
- Kumar, N. P. & Audipudi, A. V. (2015). Exploration of a novel plant growth promoting bacteria *Stenotrophomonas maltophilia* AVP27 isolated from the chilli rhizosphere soil. *International Journal of Engineering Research and General Science*. 3(1);265-277.
- Maciá-Vicente, J.G., Rosso, L.C., Ciancio, A., Jansson, H. B. & Lopez-Llorca L.V. (2009). Colonisation of barley roots by endophytic *Fusarium equiseti* and *Pochonia chlamydosporia*: Effects on plant growth and disease. *Annals of Applied Biology*.155(3);391-401
- Marasas, W.F.O., Rabie, C.J., Lu'bben, A., Nelson, P.E. Toussoun T.A., Van Wyk, P.S., (1987). *Fusarium napiforme*, a new species from millet and sorghum in southern Africa. *Mycologia* 79; 910 – 914.
- Marschner, P.; Timonen, S. 2005. Interactions between plant species and mycorrhizal colonization on the bacterial community composition in the rhizosphere. *Applied Soil Ecology*. 28:23-36
- Mehnaz S., Lazarovits G (2006). Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*,

- and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. *Microbial Ecology*. 51:326–335.
- Nelson, P.E, Toussoun, T.A, Marasas, W.F.O. (1983). *Fusarium species: an illustrated manual for identification*. Pennsylvania State University Press, University Park.
- Nosrati, S., Hosseini, S. A. E., Sarpeleh, A., Shahrabak, M. S., & Shahrabak, Y. S. (2011). Antifungal Activity of Spearmint (*Mentha Spicata* L.) Essential Oil on *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* the Causal Agent of Stem and Crown Rot of Greenhouse Cucumber in Yazd, Iran. *International Conference on Environmental and Agriculture Engineering IPCBEE*. 15.
- Richardson, A.E., Barea, J.M., McNeill, A.M., Prigent-Combaret, C. (2009). Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil* 321:305–339.
- Saldajeno, M.G.B., Hyakumachi, M. (2011). The plant growth-promoting fungus *Fusarium equiseti* and the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* stimulate plant growth and reduce severity of anthracnose and damping-off diseases in cucumber (*Cucumis sativus*) seedlings. *Annals of Applied Biology*. 159(1): 28–40.

- Santos Rodríguez, B.D., 2017. Optimización de la secuencia señal para la producción de proteínas recombinantes en el periplasma de *Escherichia coli* marcadas con SMBP (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).
- Schuster, A., Schmolli, M. (2010). Biology and biotechnology of *Trichoderma*. Applied microbiology and biotechnology. 87(3): 787–799.
- Siddiqui, Z.A.; Akhtar, M.S. 2008. Synergistic effects of antagonistic fungi and a plant growth promoting rhizobacterium, an arbuscular mycorrhizal fungus, or composted cow manure on populations of *Meloidogyne incognita* and growth of tomato. Biocontrol Sci. Techn. 18(3):279-290.
- Radjacommaré, R.; Venkatesan, S.; Samiyappan, R. 2010. Biological control of phytopathogenic fungi of vanilla through lytic action of *Trichoderma* species and *Pseudomonas fluorescens*. Phytopathology and Plant Protection. 43(1):1-17.
- Thongkamngam. T., and Jaenaksorn. T. (2017). *Fusarium oxysporum* (F221-B) as biocontrol agent against plant

pathogenic fungi in vitro and in hydroponics. *Plant Protect. Sci.* 53(2): 85–95.

Whipps, J. M. (2004). Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. *Canadian Journal of Botany.* 82(8): 1198-1227.

Zhou, X., Shen, Y., Fu, X. Wu. F. 2018. Application of Sodium Silicate Enhances Cucumber Resistance to Fusarium Wilt and Alters Soil Microbial Communities. *Front. Plant Sc.* 9:624.

REVISIÓN TÉCNICA

Dra. Rosa María Ramírez Santoyo
Unidad Académica de Ciencias Biológicas – UAZ

Dra. Mayra Judith García Robles
Universidad Politécnica de Zacatecas – Fresnillo

DISEÑO DE PORTADA

Luis Roberto Reveles Torres

CÓDIGO INIFAP

MX-0-241709-25-02-11-09-105

COMISIÓN EDITORIAL DEL CEZAC

Presidente: Dra. Raquel K. Cruz Bravo
Secretario: MC. Ricardo A. Sánchez Gutiérrez
Vocal: Dr. Luis R. Reveles Torres
Vocal: Dr. Francisco Gpe. Echavarría Cháirez
Vocal: MC. Mayra Denise Herrera

El proceso editorial de esta publicación y el formato electrónico se terminó en DICIEMBRE de 2019 en el Campo Experimental Zacatecas, Km 24.5 Carretera Zacatecas-Fresnillo. CP. 98500, Calera de V. R., Zacatecas, México.
Tel. 01 800 088 2222 ext 82328

Este documento se encuentra en formato digital, mediante página internet en descargas ilimitadas

CAMPO EXPERIMENTAL ZACATECAS

DIRECTORIO

MC. Ricardo Alonso Sánchez Gutiérrez
Director de Coordinación y Vinculación

Dr.	Guillermo Medina García	Agrometeorología y Modelaje
Dra.	Nadiezhdá Y. Ramírez Cabral	Agrometeorología y Modelaje
Ing.	José Israel Casas Flores	Agrometeorología y Modelaje
Dr.	Alfonso Serna Pérez	Fertilidad de suelos y nutrición vegetal
Ing.	José Ángel Cid Ríos	Fríjol y Garbanzo
MC.	Juan José Figueroa González*	Fríjol y Garbanzo
MC.	Mayra Denise Herrera	Fríjol y Garbanzo
Dr.	Jorge A. Zegbe Domínguez	Frutales
MC	Valentín Melero Meraz	Frutales
Ing.	Manuel Reveles Hernández	Hortalizas
MC.	Miguel Servin Palestina*	Ingeniería de Riego
Dra.	Raquel Cruz Bravo	Inocuidad de Alimentos
MC	Enrique Medina Martínez	Maíz
MC.	Francisco A. Rubio Aguirre	Pastizales y Cultivos Forrajeros
Dr.	Ramón Gutiérrez Luna	Pastizales y Cultivos Forrajeros
Ing.	Ricardo A. Sánchez Gutiérrez	Pastizales y Cultivos Forrajeros
Dr.	Luis Roberto Reveles Torres	Recursos Genéticos: Forestales, Agrícolas, Pecuarios y Microbianos
Dr.	Jaime Mena Covarrubias	Sanidad Forestal y Agrícola
Dr.	Rodolfo Velásquez Valle	Sanidad Forestal y Agrícola
Dra.	Blanca I. Sánchez Toledano	Socioeconomía

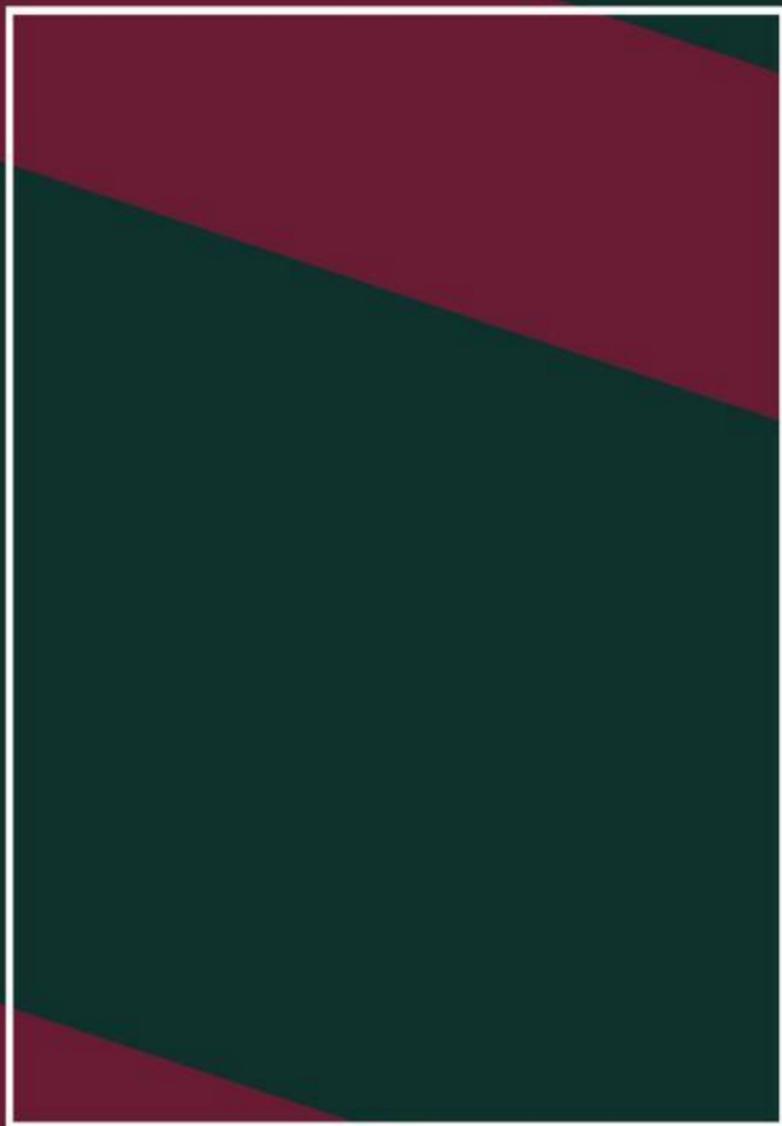
* Becarios



AGRICULTURA
SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL

inifap
Instituto Nacional de Investigaciónes,
Fitopatología y Fitosanidad

www.gob.mx/inifap



 @inifapmx

 @inifap

 /INIFAP1

 @inifap